

(2) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



02 DEC 2004



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
11. Dezember 2003 (11.12.2003)

PCT

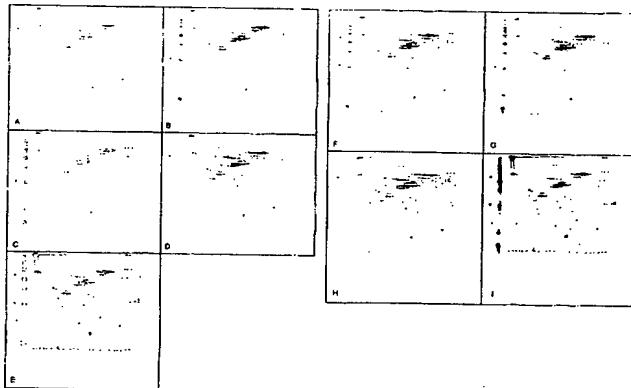
(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 03/102627 A1

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: G01T 1/29, G01N 27/447
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP03/05797
(22) Internationales Anmeldedatum: 3. Juni 2003 (03.06.2003)
(25) Einreichungssprache: Deutsch
(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
(30) Angaben zur Priorität: 102 25 841.4 3. Juni 2002 (03.06.2002) DE
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): PROTEOSYS AG [DE/DE]; Carl-Zeiss-Strasse 51, 55129 Mainz (DE).
(72) Erfinder; und
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): WOJCIECH, Wozny [PL/DE]; Gutenbergstrasse 14, 55268 Nieder-Olm (DE). CAHILL, Michael, A. [AU/DE]; Weinbergstrasse 34, 55296 Lörzweiler (DE).
(74) Anwalt: PATENTANWÄLTE RUFF, WILHELM, BEIER, DAUSTER & PARTNER; Zusammenschluss NR. 16, Kronenstrasse 30, 70174 Stuttgart (DE).
(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO,

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: DIFFERENTIAL INDICATION OF LABELED MOLECULES

(54) Bezeichnung: DIFFERENTIELLE ANZEIGE VON MARKIERTEN MOLEKÜLEN



(57) **Abstract:** The invention relates to a method for determining the local distribution of at least two sets of point radiation objects of a quantity-specific radiation type on a common support. According to a preferred embodiment, a phosphorimager IP is subjected to the radiation of the planar support during 24 hours. The phosphorimager IP integrates the radiation intensities of both radiation sources of the samples. The local distribution of the stored radiation energy of the phosphorimager IP is read with a reader and represented as a pixel matrix or an image. The local distribution determined as a pixel matrix has portions that are derived from I^{125} and I^{131} . Once this first local distribution is determined, a second local distribution is determined, whereby an absorber is disposed between the planar support and the phosphorimager IP. The absorber consists of a 900 pm thick plastic layer. The radiation intensities of the samples disposed on the planar support are integrated or added up for both local distributions determined using the same ranges. Starting from these integrated radiation sources, the local distributions already determined are used to separately calculate the local distributions of the individual isotopes. The inventive method is especially used for analyzing protein gels, in nucleic acid arrays, protein arrays, ELISA analysis etc. in proteomics.

WO 03/102627 A1

(57) **Zusammenfassung:** Die Anmeldung betrifft ein Verfahren zur Bestimmung der Ortsverteilung von mindestens zwei Mengen von Punktstrahlungsobjekten mit jeweils mengenspezifischem Strahlungstyp auf einer gemeinsamen Trägerfläche. Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform wird während 24 Stunden eine Phosphorimager-IP mit der Strahlung des flächigen Trägers beaufschlagt. Die Phosphorimager-IP integriert die Strahlungsintensitäten

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]



RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ,
UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) **Bestimmungsstaaten (regional):** ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

beider Strahlungsquellen der Proben auf. Anschliessend wird die Ortsverteilung der gespeicherten Strahlungsenergie der Phosphorimager-IP mit einem Lesegerät abgelesen und in eine Pixelmatrix bzw. ein Bild abgebildet. Die als Pixelmatrix ermittelte Ortsverteilung enthält Anteile, die sowohl von I^{125} als auch von I^{131} stammen. Direkt nach der Ermittlung dieser ersten Ortsverteilung wird eine zweite Ortsverteilung ermittelt, wobei ein Absorber zwischen dem flächigen Träger und der Phosphorimager-IP angeordnet wird. Der Absorber besteht aus einer 900 pm dicken Plastiksicht. Die Strahlungsintensitäten der auf dem flächigen Träger angeordneten Proben wurden für beide ermittelten Ortsverteilungen unter Verwendung der gleichen Bereiche aufintegriert bzw. aufsummiert. Auf Basis dieser integrierten Strahlungsintensitäten wird aus den jbeiden ermittelten Ortsverteilungen die Ortsverteilung der einzelnen Isotope getrennt berechnet. Das Verfahren wird insbesondere zur Analyse von Proteingelen, Nukleinsäure-Arrays, Proteinarrays, ELISA-Arrays u.s.w in der Proteomik verwendet.

Differentielle Anzeige von markierten Molekülen

5

Anwendungsgebiet und Stand der Technik

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Bestimmung der Ortsverteilung von mindestens zwei Mengen von Punktstrahlungsobjekten mit jeweils 10 mengenspezifischem Strahlungstyp auf einer gemeinsamen Trägerfläche.

Eine wichtige Anwendung proteomischer Studien ist die Bestimmung des Unterschieds der Häufigkeiten bestimmter Proteine oder Proteiniso-15 formen zwischen zwei oder mehr experimentell interessanten Regimen, beispielsweise der Häufigkeit von Proteinen aus Kontrollzellen, Gewe-20 ben oder Organismen, im Vergleich zu der entsprechenden Häufigkeit aus pharmakologisch behandelten Zellen, Geweben oder Organismen.

25 Die Proteinintensität für Proteinspots von unterschiedlichen Gelen aus unterschiedlichen experimentellen Regimen in der Untersuchung werden typischerweise verglichen, um zu bestimmen, ob die Menge an Protein in diesen Proteinspots sich zwischen den experimentellen Regimen unterscheidet. Dies ist ein Prinzip differentieller Darstellung, die auch als Multicolouranalyse bezeichnet wird. Die Zuordnung von Proteinspotko-30 ordinaten und die Identifizierung entsprechender Proteinspots auf ver-schiedenen 2D-Gelen wird Matchingverfahren (matching procedure) ge-nannt und ist wegen des nicht reproduzierbaren Verhaltens verschie-de-ner Gele, die durch 2D-PAGE erzeugt werden, potentiell problematisch.

35 Deshalb ist das Matchingverfahren ein zeitaufwändiger Schritt und ist derzeit nur wenig automatisierbar.

Es kann beispielsweise durch Messen der verschiedenen Proben in ver-schiedenen experimentellen Systemen eine grobe Multicolouranalyse

durchgeführt werden. Hierbei können beispielsweise Proteine aus unterschiedlichen Proben in jeweils separaten 2-D-PAGE-Experimenten behandelt werden, gefolgt von einem Nachweis der Spots, die Proteinen in den verschiedenen 2D-PAGE-Gelen entsprechen, und Vergleich der für 5 jede Proben von jedem Gel oder jeder Gruppe von replizierten Gelen erhaltenen Spotmuster. Die Spotmuster werden typischerweise in grafischen Gel-Bilddateien gespeichert, wie z. B. TIFF-Dateien. Herkömmliche Softwareprogrammalgorithmen richten diese Gel-Bilddateien zueinander aus, so dass Pixel in allen Bildern mit Pixeln aus anderen 10 Bildern verglichen werden können. Typischerweise wird ein „zusammengesetztes Gel-Bild“ (composite gel image) aus replizierten 2D-PAGE-Gel-Bildern für eine Probe hergestellt, das Mittelwerte der Spotintensitäten von allen Replikatgelen für eine bestimmte Probe enthält. Die 15 Kompositgelle aus verschiedenen Proben werden typischerweise miteinander verglichen, um Unterschiede in Proteinhäufigkeiten zwischen den Proben aufzuzeigen. Die beiden Haupteinschränkungen dieses Ansatzes sind Spotmatching, das die korrekte Zuordnung der entsprechenden Spots ermöglicht und die quantitative Auswertung der Spots, die einen Vergleich der Proteinmengen in Spots aus verschiedenen 2D-Gelen ermöglicht. 20

Um eine feinere differentielle Darstellung zu erzeugen, werden Analytikmoleküle aus verschiedenen Proben typischerweise mit Reagenzien markiert bzw. modifiziert, so dass die Proben vermischt und gemeinsam 25 analysiert werden können. So kann das aufwändige und fehlerträchtige Matchingverfahren vermieden werden. Anschliessend können die Proteine von jeder Probe aufgrund ihrer Markierung unabhängig vom Vorhandensein der Proteine aus der (den) anderen Probe(n) nachgewiesen werden.

30

Ein Beispiel sind die DIGE-Fluoreszenzreagenzien auf Basis von Cye-Farbstoffen, die von Amersham Biosciences (Freiburg, Deutschland) angeboten werden. Proteine aus beiden Proben werden mit unterschied-

lichen Fluoreszenzreagenzien separat markiert, dann vermischt und gemeinsam der Elektrophorese in 2D-PAGE unterzogen. Die verschiedenen Fluoreszenzgruppen in jeder Probe werden durch unterschiedliche Wellenlängen angeregt und emittieren Licht bei unterschiedlichen

5 Wellenlängen. Durch Verwendung geeigneter Lichtfilter ist es möglich, Bilder von Proteinen jeder Probe zu erhalten, unabhängig von der Verteilung der Proteine aus der anderen Probe. Diese Bilder können dann durch entsprechende Softwarepakte analysiert werden.

10 Ein weiterer Ansatz für eine feinere differentielle Darstellung ist die Markierung von Analysatmolekülen aus verschiedenen Proben mit radioaktiv strahlenden Isotopen. Die radioaktive Markierung von Analysatmolekülen und ihr Nachweis durch geeignete Detektoren ist um mehrere Größenordnungen empfindlicher als andere Verfahren, beispielsweise das

15 oben genannte Verfahren unter Verwendung von Cye-Farbstoffen.

Ein Analyseverfahren, bei dem Analysatmoleküle mit radioaktiv strahlenden Isotopen markiert werden, ist beschrieben in:

20 Monribot-Espagne C, Boucherie H, Differential gel exposure, a new methodology for the two-dimensional comparison of protein samples. Proteomics, 2002, 2:229-240.

Bei der Markierung von Analysatmolekülen mit radioaktiv strahlenden Isotopen ist es notwendig, die radioaktive Strahlung bzw. die Aktivität der Isotope zu bestimmen. Die Kerne radioaktiver Isotope sind instabil. Sie neigen dazu unter Freisetzung von Partikeln oder Photonen spontan zu zerfallen. Durch radioaktive Substanzen werden mehrere verschiedene Arten von Partikeln freigesetzt. Von allgemeiner Bedeutung sind

25 30 das Elektron, das Positron, das Alphateilchen und das Neutron. Die Emission dieser Partikel ist häufig, aber nicht immer, begleitet von der Ausstrahlung von Gammastrahlen. Eine andere Art des radioaktiven Zerfalls ist der spontane Einfang eines Elektrons der K-Schale durch

den Kern, was als K-Elektroneneinfang bekannt ist. Strahlungsdetektoren sind Geräte, die entwickelt wurden, um diese verschiedenen Arten von Strahlung nachzuweisen.

- 5 Die folgenden räumlich auflösenden Detektoren werden zur quantitativen Analyse von radioaktiven Molekülen verwendet, die in einem Array oder auf einer Oberfläche, wie einem DNA-Array oder einem 2D-PAGE-Proteingel, vorhanden sind und ersetzen zu diesem Zwecke einen photographischen Film. Von den vier zitierten Beispielen beruhen die Detektortypen 2, 3 und 4 auf den obigen Prinzipien.
- 10
- 15 1. Autoradiographie mit Phosphorimagnern, die gemäss der Prinzipien von Geräten arbeiten, die eine Bildplatte verwenden, wie die derzeit von den Firmen Fuji Photo Film Co. Ltd (Tokio), Packard Bioscience GmbH (Dreieich Deutschland), AGFA-Gevaert N.V. (Mortsel, Belgien) oder Amersham Biosciences (Freiburg, Deutschland) angebotenen Geräte. Amemiya Y, Miyahara J. Imaging plate illuminates many fields. *Nature*, 1988, 336:89-90.
- 20 Miyahara, J. The imaging plate: a new radiation image sensor. *Chemistry Today*, 1989, 223: 29-36.
- 25 2. PPAC-Ionisationsgaskammern (parallel plate avalanche chamber), die mit Mikrokanalplattenanalysatoren (Microchannel Plate Analysers) zum Nachweis von Betapartikeln gekoppelt sind, wie der Beta Imager, der von BioSpace Measures (Paris), und ein ähnliches Gerät, das von Packard Bioscience (Dreieich, Deutschland) vertrieben wird.
- 30 Bei diesen Imagern wird Licht von den PPAC durch eine Linse in eine Mehrfaserbildverstärkerröhre fokussiert, von der das Signal durch eine CCD-Kamera erfasst wird.

Laniece P, Charon Y, Dumas S, Mastrippolito R, Pinot, L, Tricoire H, Valentin L. HRRI: a high resolution radioimager for fast, direct quantification in in situ hybridization experiments. *Biotechniques*, 1994, 17:338-345.

5

Crumeyrolle-Arias M, Latouche J, Laniece P, Charon Y, Tricoire H, Valentin L, Roux P, Mirambeau G, Leblanc P, Fillion G, et al. "In situ" characterization of GnRH receptors: use of two radioimagers and comparison with quantitative autoradiography. *J. Recept Res*, 1994, 14:251-265.

10

Jeavons, AG. Method and apparatus for quantitative autoradiography analysis. 11. August 1992. USA-Patent 5138168. Inhaber: Oxford Position Systems Limited.

15 Decristoforo C, Zagnun J, Kohler B, Oberladstaetter M, Riccabona G. The use of electronic autoradiography in radiopharmacy. *Nucl. Med. Biol.*, 1997, 24: 361-365.

20 3. Geräte wie der Micro Imager (BioSpace Measures, Paris), bei dem eine Szintillationsfläche zum Nachweis von Beta- Gamma- und Alpha- partikeln mit Mikrokanalplattenanalysegeräten gekoppelt ist. In diesen Imagern tritt Licht von der Szintillationsfläche in eine Mehrfaserbildverstärkerröhre ein, von der das Signal durch eine CCD-Kamera eingefangen wird.

25

Laniece P, Charon Y, Dumas S, Mastrippolito R, Pinot, L, Tricoire H, Valentin L. HRRI: a high resolution radioimager for fast, direct quantification in in situ hybridization experiments. *Biotechniques*, 1994, 17:338-345.

30

Crumeyrolle-Arias M, Latouche J, Laniece P, Charon Y, Tricoire H, Valentin L, Roux P, Mirambeau G, Leblanc P, Fillion G, et al. "In situ" char-

acterization of GnRH receptors: use of two radioimagers and comparison with quantitative autoradiography. J. Recept Res, 1994, 14:251-265.

Jeavons, AG. Method and apparatus for quantitative autoradiography
5 analysis. 11. August 1992. USA-Patent 5138168. Inhaber: Oxford Position Systems Limited.

Decristoforo C, Zagnun J, Kohler B, Oberladstaetter M, Riccabona G. The use of electronic autoradiography in radiopharmacy. Nucl. Med. 10 Biol. 1997, 24: 361-365.

4. Szintillationskristallarrayimager, die einen räumlich auflösenden Photomultiplier verwenden, wie die MPD-Imager (Multi Photon Detection), die von BioTraces Inc. (Herndon VA, USA) und ProteoSys AG (Mainz, 15 Deutschland) vertrieben werden.

Drukier AJ, Sagdejev IR, Ultralow background multiple photon detector. 2. Februar 1999. USA Patent 5,866,907. Inhaber: BioTraces, Inc. (Herndon, VA).

20 Im Gegensatz zu den obigen Detektortypen 2, 3 und 4 ist eine Phosphorimagerbildplatte (Phosphorimager Imaging Plate, Phosphorimager-IP) ein filmartiger Strahlungsbildsensor, der speziell konstruierten Phosphor enthält, der die Strahlungsenergie aufnimmt und speichert, damit sie zu 25 einem späteren Zeitpunkt wieder freigegeben und in einem geeigneten Phosphorimagerauslesegerät gemessen werden kann. Ein Phosphorimagergerät ist ein kombiniertes System bestehend aus einem Phosphorimagerauslesegerät und einer Phosphorimagerbildplatte, das nachfolgend als Phosphorimager bezeichnet wird. Ein Phosphor ist ein Pulver 30 oder eine kristalline Substanz, die nach Einwirkung von Photonen bestimmter Eigenschaften oder chemischer Reaktionen Licht emittiert. Lichtemission (Lumineszenz) von einem Phosphor kann momentane (Fluoreszenz), verzögerte (Phosphoreszenz) oder photostimulierte Lu-

mineszenz (PSL) sein. Der Phosphor der Phosphorimager-IP nutzt das PSL-Phänomen, das weder Fluoreszenz noch Phosphoreszenz ist. PSL verwendet eine Substanz, welche die Energie einer ursprünglichen Stimulation, beispielsweise die Energie eines Photons, das von einem radioaktiv zerfallenden Atom emittiert wird, in den Elektronenorbitalen von Atomen des Phosphors speichert. Diese Energie wird als Licht emittiert, wenn der Phosphor durch Licht mit einer größeren Wellenlänge als die der ersten Stimulation stimuliert wird. Auf diese Weise speichert der Phosphor Information über die Menge an Strahlung, der er ausgesetzt war, und gibt diese Information als Licht ab, das in einem geeigneten Gerät, wie einem im Handel erhältlichen Phosphorimager, quantitativ analysiert werden kann.

Die Bestrahlung von Proben im Phosphorimager wird in ähnlicher Weise durchgeführt wie die Belichtung eines Photofilms. Die bestrahlte Phosphorimager-IP wird während der Beförderung, mit einem fokussierten Laserstrahl abgetastet (beispielsweise einem He-Ne-Laser). Die bei Bestrahlung der Phosphorkristalle mit dem Laserlicht freigesetzte PSL wird in einem Photomultiplierrohr (PMT, photomultiplier tube) durch einen Lichtsammelleiter gesammelt und in elektrische Signale umgewandelt.

Von den Typen radioaktiver Messgeräte wie sie oben diskutiert wurden (Phosphorimagers, PPAC-Ionisationsgaskammerdetektoren, Szintillationskristallarrayimager mit einem räumlich auflösenden Photomultiplier, durch eine CCD-Kamera abgebildete Szintillatorfläche), können Szintillationskristallarrayimager verschiedene Isotope unter Verwendung von Energie und Partikeltyp (beta/gamma) durch Analysieren der nachgewiesenen Impulsform verschiedener emittierter Partikel differenzieren. PPAC-Ionisationsgaskammerdetektoren (z. B. Beta Imager) und von einer CCD-Kamera abgebildete Szintillationsflächen (z. B. Micro Imager) erfordern den Nachweis der äußerst schwachen Betapartikel von H-3 zusätzlich zu einem anderen Isotop, um verschiedene Radioisotope zu

unterscheiden, wie es der Hersteller in seiner Beschreibung angibt. Diese Detektoren können mit H-3 markierte Proteine nicht direkt aus einem 2D-PAGE-Gel nachweisen, weil die Polyacrylamidmatrix die schwachen H-3 Betapartikel absorbiert. Analysatmoleküle müssen aus dem Polyacrylamidgel entfernt werden, beispielsweise durch Blotting auf eine Membran, damit sie durch PPAC-Ionisationsgaskammerdetektoren nachgewiesen werden können. Dies ist zeitaufwändig und funktioniert beispielsweise für Proteine mit unterschiedlichem Molekulargewicht nur mit variabler Effizienz. Mit stärkeren betaemittierenden Isotopen, wie S-135, markierte Analysatmoleküle können durch Ionisationsgaskammern effizient sichtbar gemacht werden, während sie sich noch in einer Polyacrylamidgelmatrix befinden, und brauchen nicht geblottet zu werden. Szintillationskristallarrayimager, die einen räumlich auflösenden Photomultiplier verwenden und Ionisationsgaskammern belegen jedoch ein Gerät für die gesamte Zeit der radioaktiven Bestrahlung. Deshalb sind Analysen, beispielsweise in Protein- oder Genomstudien, die einen hohen Durchsatz erfordern sehr teuer.

Nachfolgend werden weitere herkömmliche differentielle Nachweisverfahren beschrieben, die jedoch nicht zu einem differentiellen Nachweis von Analysatmolekülen auf einer Trägerfläche verwendbar sind.

Die quantitative Bestimmung von der in einer Materialprobe vorhandenen Konzentration von zwei unterschiedlichen Elementen unter Verwendung von zwei Messungen mit einem Detektor ist beschrieben in: Sastri et al., Anal. Chem., 1981, 53: 765-770.

Bei diesem Verfahren wird jedoch lediglich die Konzentration der Elemente in der Materialprobe, nicht jedoch deren Ortsverteilung, beispielsweise auf der Probenoberfläche, berechnet. Das hier beschriebene Verfahren eignet sich daher nicht zur differentiellen Analyse von Analysatmolekülen, die mit unterschiedlichen Isotopen markiert werden.

Die hyperspektrale Verarbeitungssoftware MultiSpec© der Purdue University (Purdue Research Foundation, West Lafayette, IN) verwendet Spektralmessungen von Bildern, um verschiedene Merkmale von Satellitenbildern zu extrahieren bzw. zu identifizieren. Das MultiSpec©-
5 Konzept sieht vor, die spektrale Besetzung von Pixeln von einem Bild in eine Reihe von Bildern zu zerlegen, die alle von einem Stammbild abgeleitet sind, für das die primären Daten alle gleichzeitig aufgezeichnet wurden. Bei diesem Verfahren werden folglich, ausgehend von einem Stammbild, verschiedenen von diesem Ursprungsbild abgeleitete Bilder
10 durch mathematische Verfahren erzeugt.

David Landgrebe, Information Extraction Principles and Methods for Multispectral and Hyperspectral Image Data, Chapter 1 of Information Processing for Remote Sensing, herausg. von C.H. Chen, veröffentlicht
15 von der World Scientific Publishing Co., Inc, 1060 Main Street, River Edge, NJ 07661, USA, 2000.

Da die radioaktive Markierung von Analysatmolekülen oft das Mittel der Wahl ist, um die in vielen Untersuchungen, beispielsweise biologischen
20 Untersuchungen, erforderliche analytische Leistung zu erreichen, und da der differentielle Nachweis von Analysatmolekülen aus zwei oder mehr Proben in einer Analyse wünschenswert ist, besteht ein großer Bedarf einen derartigen differentiellen Nachweis mit radioaktiv markierten Analysaten oder anderen Molekülen durchzuführen.

25

Aufgabe und Lösung

Aufgabe der Erfindung ist es daher eine Verfahren bereitzustellen, welches differentielle Analysen, beispielsweise in Protein- oder Genomstudien, mit hoher analytischer Leistung und hohem Durchsatz bei vergleichsweise geringen Kosten ermöglicht und die beschriebenen Nachteile des Standes der Technik überwinden hilft.
30

Diese Aufgabe wird gelöst durch ein Verfahren mit den Merkmalen des Anspruchs 1. Bevorzugte Weiterbildungen der Erfindung sind in den abhängigen Ansprüchen 2 bis 19 aufgeführt. Der Wortlaut sämtlicher Ansprüche wird hiermit durch Bezugnahme zum Inhalt dieser Beschreibung gemacht.

Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren wird die Ortsverteilung von mindestens zwei Mengen von Punktstrahlungsobjekten mit jeweils mengenspezifischem Strahlungstyp auf einer gemeinsamen Trägerfläche mit folgenden Schritten bestimmt: a) Ermitteln einer ersten Ortsverteilung der Strahlungsintensität der Trägerfläche, b) Verändern der Strahlungsintensität mindestens eines mengenspezifischen Strahlungstyps mit einem zugehörigen Veränderungsfaktor, c) Ermitteln mindestens einer zweiten Ortsverteilung der Strahlungsintensität der Trägerfläche und d) Berechnung der Ortsverteilungen jeder der mindestens zwei Mengen von Punktstrahlungsobjekten einzeln aus der ersten und der mindestens zweiten ermittelten Ortsverteilung.

Unter Ortsverteilung von Punktstrahlungsobjekten ist beispielsweise die Strahlungsintensität und/oder die Anzahl der jeweiligen Punktstrahlungsobjekte pro Flächeneinheit über dem Ort bzw. über der zu untersuchenden Trägerfläche zu verstehen. Es werden die Ortsverteilungen von mindestens zwei Mengen von Punktstrahlungsobjekten mit jeweils mengenspezifischem Strahlungstyp untersucht. Ein Punktstrahlungsobjekt ist ein Objekt, beispielsweise ein Atom bzw. dessen Isotop und/oder ein Molekül bestehend aus Gruppen von Atomen bzw. Isotopen, das seine spezifische Strahlung nach allen Seiten, d.h. über den Raumwinkel, gleichmäßig oder zumindest idealisiert gleichmäßig abgibt. Bei dem mengenspezifischen Strahlungstyp kann es sich beispielsweise um Alpha-, Beta-, Gamma- und/oder Röntgenstrahlung und/oder um Licht mit einer spezifischen Wellenlänge handeln. Die mindestens zwei Mengen bestehen jeweils aus Punktstrahlungsobjekten mit gleichem, mengen-

spezifischen Strahlungstyp und befinden sich gemeinsamen auf der Trägerfläche. Die Trägerfläche ist ein im wesentlichen flächiges Gebilde, beispielsweise ein 2D-PAGE-Gel.

- 5 In dem ersten Schritt a) des erfindungsgemäßen Verfahrens wird eine erste Ortsverteilung der Strahlungsintensität, d.h. die Strahlungsleistung pro Flächeneinheit, der Trägerfläche ermittelt.

In dem zweiten Schritt b) wird die Strahlungsintensität mindestens eines 10 mengenspezifischen Strahlungstyps mit einem zugehörigen Veränderungsfaktor, der bekannt ist oder bestimmt bzw. berechnet werden kann, verändert. Die Veränderung kann eine Reduktion oder eine Verstärkung 15 der Intensität des mengenspezifischen Strahlungstyps sein. Der Veränderungsfaktor wird in % angegeben, wobei 0% eine vollständige Unterdrückung der Strahlungsintensität, 100% ein Gleichbleiben der Strahlungsintensität und Werte größer als 100% eine Verstärkung der Strahlungsintensität bedeuten.

Es können alle Intensitäten der mengenspezifischen Strahlungstypen, 20 nur ein Teil der Intensitäten der Strahlungstypen oder nur eine Intensität eines Strahlungstyp durch einem zugehörigen Veränderungsfaktor verändert werden. Das Verhältnis bzw. die Verhältnisse der Veränderungsfaktoren der mengenspezifischen Strahlungstypen weist bzw. weisen vorzugsweise einen Wert bzw. Werte ungleich 1 auf, d.h. die Veränderungsfaktoren der mengenspezifischen Strahlungstypen unterscheiden 25 sich vorteilhafterweise untereinander.

In einem weiteren Schritt c) wird nach der Veränderung der Strahlungsintensitäten mindestens eine zweite Ortsverteilung der Strahlungsintensität der Trägerfläche ermittelt.

In einem vierten Schritt d) werden die Ortsverteilungen jeder der mindestens zwei Mengen von Punktstrahlungsobjekten einzeln aus der ersten und der mindestens zweiten ermittelten Ortsverteilung berechnet.

- 5 Durch die Berechnung wird auf Basis der ermittelten mindestens zwei Ortsverteilungen die Ortsverteilung jeder Menge von Punktstrahlungsobjekten auf der Trägerfläche separat ermittelt, unabhängig von der Verteilung der anderen Mengen von Punktstrahlungsobjekten auf der Trägerfläche. Die Auftrennung in die mengenspezifischen Ortsverteilungen er-
10 folgt nicht bereits durch den Detektor, sondern erst durch Berechnung auf Basis der ermittelten Ortsverteilungen, die eine Überlagerung der detektierten Signale der einzelnen Strahlungsquellen darstellen.

- 15 In einer vorteilhaften Weiterbildung der Erfindung wird der Verände-
rungsschritt b) und der Schritt c) zur Ermittlung der mindestens zweiten Ortsverteilung der Strahlungsintensität der Trägerfläche mit einem un-
terschiedlichen Veränderungsfaktor mindestens einmal wiederholt. Dies ist notwendig, wenn mehr als zwei Mengen von Punktstrahlungsobjekten analysiert werden sollen, da zur Bestimmung der einzelnen Ortsver-
20 teilung einer Menge mindestens eine Ortsverteilung bei zugehöriger Ver-
änderung der Intensität des mengenspezifischen Strahlungstyps ermit-
telt werden muss.

- 25 Werden nur zwei Mengen von Punktstrahlungsobjekten analysiert, kann durch eine derartige Wiederholung die Genauigkeit des Verfahrens ver-
bessert werden. Dies wird insbesondere dadurch erreicht, dass die Ver-
änderungsfaktoren durch unterschiedliche Mechanismen, beispielsweise mit Hilfe eines Absorbers und/oder nachfolgend durch radioaktiven Zer-
fall, realisiert werden.

30

In einer weiteren vorteilhaften Weiterbildung der Erfindung wird eine er-
mittelte Ortsverteilung der Strahlungsintensität durch eine zugehörige

Pixelmatrix dargestellt, wobei ein Pixelwert der Matrix die Strahlungsintensität eines zugehörigen Orts auf der Trägerfläche repräsentiert.

Bei der Ermittlung der Ortsverteilungen der Strahlungsintensität der Trägerfläche, beispielsweise mit einem geeigneten ortsauf lösenden Detektor, wird die Ortsverteilung der Strahlungsintensität der Trägerfläche in eine Matrixanordnung von Pixelwerten umgesetzt, wobei die Pixelwerte proportional zu der vom Detektor ermittelten Strahlungsintensität sein können. Jedes Pixel wird einer definierten Region der Fläche zugeordnet.

In einer weiteren vorteilhaften Weiterbildung der Erfindung wird die Ortsverteilung jeder der mindestens zwei Mengen von Punktstrahlungsobjekten einzeln auf Basis der Pixelmatrizen bestimmt.

Bei einem rein illustrativen Beispiel kann die Berechnung, bei einer Analyse von zwei Mengen A und B von Punktstrahlungsobjekten und einem Veränderungsfaktor von 0%, d.h. einer vollständigen Unterdrückung, für den Strahlungstyp der Menge A und einem Veränderungsfaktor von 100%, d.h. einem Gleichbleiben, für den Strahlungstyp der Menge B, wie folgt durchgeführt werden.

Durch die vollständige Unterdrückung des Strahlungstyps A in der zweiten ermittelten Ortsverteilung erhält man direkt die überlagerungsfreie Ortsverteilung für den Strahlungstyp B. Durch Subtraktion der zweiten ermittelten Ortsverteilung, bei der nur Signalanteile des Strahlungstyps der Menge B vorhanden sind, von der ersten ermittelten Ortsverteilung, bei der beide Signalanteile vorhanden sind, erhält man die Ortsverteilung des Strahlungstyps der Menge A ohne Signalanteile des Strahlungstyps B.

Das genannte Verfahren ermöglicht, unter Verwendung desselben bzw. eines gleichartigen Detektors, eine Multicolourmessung, d.h. eine ge-

trennte, überlagerungsfreie Darstellung der Ortsverteilung der einzelnen Punktstrahlungsquellen, ermöglicht. Herkömmliche Verfahren erfordern für eine Multicolourdarstellung die originalen Einfarbenbilder von Analyt molekülen von jeder Probe. Bei der vorliegenden Erfindung werden

5 die Einfarbenbilder jedes Isotops niemals als solche gemessen, sondern werden aus den mindestens zwei ermittelten Ortsverteilungen bzw. Bildern berechnet.

In der Praxis werden die den unterschiedlichen Strahlungstypen zugehörigen Signalkomponenten vorteilhafterweise um einen Faktor von weniger als 100 % oder 95 % verändert bzw. reduziert. Eine Möglichkeit zur Berechnung der überlagerungsfreien Ortsverteilung der beiden Mengen von Punktstrahlungsobjekten wird nachfolgend ausgeführt.

15 Für einen exemplarischen Pixelwert der Pixelmatrix der ersten ermittelten Ortsverteilung gilt:

$$A + B = X \quad (1)$$

Für den Pixelwert der zweiten ermittelten Ortsverteilung gilt:

20 $MA + NB = Y \quad (2)$:

Wobei

$A =$ der Signalbeitrag des Strahlungstyps A in der ersten ermittelten Ortsverteilung

25 $B =$ der Signalbeitrag des Strahlungstyps B in der ersten ermittelten Ortsverteilung

$X =$ Pixelwert entsprechend der Strahlungsintensität in der ersten ermittelten Ortsverteilung

$Y =$ Pixelwert entsprechend der Strahlungsintensität in der zweiten ermittelten Ortsverteilung

$M =$ Veränderungsfaktor für den mengenspezifischen Strahlungstyp A

N = Veränderungsfaktor für den mengenspezifischen Strahlungstyp
B

A und B sind unbekannt und gesucht.

5 X und Y sind die gemessenen Intensitäten.

M und N können durch Kalibrierung oder Berechnung bestimmt werden.

Das Verhältnis der Veränderungsfaktoren zweier Strahlungstypen ist definiert als das Verhältnis des Veränderungsfaktors des Strahlungstyps

10 mit dem kleineren Veränderungsfaktor und dem des Strahlungstyps mit dem grösseren Veränderungsfaktor (M/N mit $N \geq M$). Entsprechend werden die Verhältnisse der Veränderungsfaktoren bei mehr als zwei Strahlungstypen definiert.

15 Durch Lösen des Gleichungssystems bestehend aus den Gleichungen (1) und (2) können die Werte für A und B berechnet werden. Diese Berechnung kann analog für alle Pixel der Pixelmatrix durchgeführt werden.

20 Ist die Strahlungsintensität bzw. der Signalbeitrag eines Strahlungstyps an einem Ort bekannt, kann dadurch auch die Anzahl der Punktstrahlungsobjekte pro Flächeneinheit an dem Ort berechnet werden, da die Strahlungsintensität und die Anzahl der Punktstrahlungsobjekt pro Flächeneinheit zueinander proportional sind.

25

In einem allgemeineren Fall mit einer Anzahl P von Mengen von Punktstrahlungsobjekten, bei dem es notwendig ist, P Ortsverteilungen zu ermitteln, kann das Problem unter Verwendung einer Matrixdarstellung formuliert werden:

30

$$F * X = I$$

wobei:

X = ein Vektor mit P Elementen, bestehend aus den Signalbeiträgen der Strahlungstypen der P Mengen von Punktstrahlungsobjekten in der ersten ermittelten Ortsverteilung

I = ein Vektor mit P Elementen, bestehend aus den Pixelwerten der 5 ermittelten Ortsverteilungen

F = eine Matrix mit P^*P Elementen, bestehend aus den P^*P Veränderungsfaktoren, die für die P ermittelten Ortsverteilungen für die P verschiedenen Mengen von Punktstrahlungsobjekten berechnet oder bestimmt wurden.

10

Die einzelnen Signalbeiträge der Strahlungstypen des Vektors X können durch Inversion der Matrix F gemäss folgender Gleichung berechnet werden:

15
$$X = F^{-1} * I$$

In einer Weiterbildung der Erfindung wird die Ortsverteilung jeder der mindestens zwei Mengen von Punktstrahlungsobjekten einzeln auf Basis von Intensitäten bestimmt, die sich durch die Summation von Pixelwerten definierter, insbesondere benachbarter, Elemente der Pixelmatrix ergeben. Anstatt den Algorithmus wie oben beschrieben für eine pixelweise Analyse zu verwenden, können auch die aufsummierten Pixelintensitäten bestimmter Bereiche verwendet werden, die für die erste und die zweite ermittelte Ortsverteilung errechnet werden können. Dies ist 25 besonders bei stark verrauschten Signalen oder in solchen Fällen empfehlenswert, bei denen die räumliche Verteilung der Signale auf dem Detektor für die verschiedenen Mengen von Punktstrahlungsobjekten veränderlich ist.

30 Vorzugsweise werden mehr Messungen der Ortsverteilungen unter veränderten Bedingungen durchgeführt als minimal notwendig wären. In diesem Fall wird ein Optimierungsprozess verwendet, um die einzelnen

Ortsverteilungen der Punktstrahlungsobjekte zu bestimmen. Hierdurch kann die Genauigkeit der Methode verbessert werden.

5 In einer Weiterbildung der Erfindung besteht eine Menge von Punktstrahlungsobjekten aus mindestens einem strahlenden, insbesondere radioaktiv strahlenden, Typ von Isotopen. Als Isotope können beispielsweise I-125 und/oder I-131 verwendet werden.

10 In einer Weiterbildung der Erfindung besteht eine Menge von Punktstrahlungsobjekten aus lichtemittierenden, insbesondere fluoreszierenden, phosphoreszierenden und/oder lumineszierenden, Substanzen.

15 In einer Weiterbildung der Erfindung ist für mindestens eine Menge unterschiedlicher Punktstrahlungsobjekte an mindestens einem Ort auf der Trägerfläche mindestens ein Kalibrierungspunkt mit bekannter Strahlung vorhanden. Die Kalibrierung dient der Bestimmung bzw. der Berechnung der jeweiligen Veränderungsfaktoren, die zur Berechnung der gesuchten einzelnen Ortsverteilungen benötigt werden.

20 25 Eine Kalibrierungspunkt kann eine einzelne Signalquelle sein, beispielsweise ein einzelnes radioaktives Isotop. Die Kalibrierung dient hier dem Zweck, den absoluten oder relativen Prozentanteil der Veränderung bzw. Reduktion von Signalintensitäten zu berechnen, die von den untersuchten Strahlungsquellen bzw. Isotopen herrühren.

30 Die Kalibrierung kann durch Einbringen eines radioaktiven Ausgangsstoffes für eines oder mehrere der untersuchten Isotope in der Messung durchgeführt werden. Das von diesem Kalibrierungsstoff gemessene Signal sollte bevorzugt keine bzw. vernachlässigbare Anteile von allen anderen radioaktiven Quellen außerhalb des Kalibrierungsstoffes enthalten. Bevorzugt ist die spezifische Aktivität des Kalibrierungsstoffes vor der Messung bekannt. Bevorzugt ist der Kalibrierungsstoff für alle untersuchten Isotope verfügbar. Eine Kalibrierung ist auch unter Verwendung

einer oder mehrerer radioaktiver Stoffe möglich, die räumlich gemeinsam lokalisiert, bekannte Mengen aller zu messenden Isotope enthalten. In diesem Fall müssen die spezifischen Aktivitäten bzw. Strahlungsintensitäten jedes Isotops im Kalibrierungsstoff bekannt sein. Mit Hilfe geeigneter Algorithmen ist es auf Basis von mehreren ermittelten Ortsverteilungen möglich, den Beitrag jedes Isotops zum jeweiligen Pixelwert der Ortsverteilung zu berechnen, wobei in einer Ortsverteilung eine oder mehrere Strahlungsintensitäten der Isotope im Signal verändert werden. Offensichtlich müssen im letzteren Fall andere Faktoren bekannt sein, beispielsweise der differentielle Grad des radioaktiven Zerfalls etc..

Wenn ein Absorber verwendet wird, hängen die Veränderungsfaktoren vom Absorbermaterial, seiner Dicke und seinem Massenabsorptionskoeffizienten für die Arten von absorbierten radioaktiven Partikeln ab. Wenn differentielle Bilder produziert werden, indem beide Isotopen zerfallen, können die Veränderungsfaktoren durch Messen der relativen Intensitäten der Kalibrierungsstoffe für beide Isotope bestimmt werden. Oder sie können unter Verwendung von Informationen bezüglich der exakten Zeit und Dauer jeder Bestrahlung und der Zerfallsratenkonstanten für jedes Radioisotop berechnet werden.

In einer Weiterbildung der Erfindung liegt das Verhältnis der Veränderungsfaktoren der mengenspezifischen Strahlungstypen zwischen 5% bis 90%, vorzugsweise zwischen 10% bis 70%, insbesondere zwischen 15% und 50%. Durch die Möglichkeit mit Veränderungsfaktoren zu arbeiten, die einen Strahlungstyp nicht vollständig unterdrücken, steigt die Zahl der verwendbaren Strahlungsquellen bzw. Detektoren deutlich an. Insbesondere bei einer Realisierung der Veränderungsfaktoren durch radioaktiven Zerfall von unterschiedlich strahlenden Isotopen besteht die Möglichkeit, auch ohne vollständigen Zerfall eines Isotopentyps, die getrennten Ortsverteilungen der Isotope zu berechnen.

In einer Weiterbildung der Erfindung wird der Veränderungsfaktor durch Verwendung mindestens eines Absorbers realisiert. Ein Absorber reduziert die Intensität der durch das Material hindurchtretenden Strahlung (Partikel oder Photonen). Der Absorber kann aus Metall, Metalllegierung, Kunststoff, Plexiglas, Teflon und/oder einem anderen geeigneten Material bestehen. Für die Funktion der Erfindung ist es wesentlich, dass die emittierten Strahlungstypen, beispielsweise Photonen von I-125-Isotopen und Beta-Partikel von I-131-Isotopen, die das Signal auf dem Detektor erzeugen, vom Absorber mit unterschiedlichen Veränderungsfaktoren bzw. Reduktionsfaktoren absorbiert bzw. gedämpft werden. Zu diesem Zweck sind Absorber aus Elementen mit niedriger Atomzahl effektiver, beispielsweise Aluminiumfolie oder dünnes Plexiglas, da diese Absorber Beta-Partikel stärker absorbieren als Photonen. Des Weiteren können Absorber aus einer sehr dünnen Schicht aus Elementen mit hoher Atomzahl verwendet werden, da diese Absorber Photonen stärker absorbieren als Beta-Partikel. Die Absorberdicke spielt bei der Absorptionseffizienz eine Schlüsselrolle.

In einer Weiterbildung der Erfindung wird der Veränderungsfaktor durch radioaktiven Zerfall der jeweiligen Punktstrahlungsobjekte der mindestens zwei Mengen realisiert, wobei vorzugsweise die jeweiligen Punktstrahlungsobjekte der mindestens zwei Mengen unterschiedliche Halbwertszeiten aufweisen. Die Veränderung bzw. Reduktion der Strahlungsintensität kommt hier nicht durch einen Absorber, sondern durch einen Unterschied in der Zerfallsrate der Punktstrahlungsobjekte zustande. Die Isotope I-125 und I-131 sind beispielsweise für diesen Zweck gut geeignet, da ihre Halbwertszeiten sich um einen Faktor von fast 7,5 unterscheiden. Es können jedoch für die Erfindung auch andere Isotope verwendet werden.

30

In einer Weiterbildung der Erfindung wird der Veränderungsfaktor durch eine unterschiedliche Empfindlichkeit eines zur Ermittlung einer Ortsverteilung der Strahlungsintensität der Trägerfläche verwendeten Detektors

für den jeweils mengenspezifischen Strahlungstyp realisiert. Die Veränderungsfaktoren der Strahlungsintensitäten der mengenspezifischen Strahlungstypen ergeben sich hierbei durch die unterschiedlichen Empfindlichkeiten der verwendeten Detektoren für die von den mindestens

5 zwei Mengen von Punktstrahlungsobjekten abgestrahlte Strahlung. Die unterschiedlichen Empfindlichkeiten werden vorzugsweise so gewählt, dass das Verhältnis der Veränderungsfaktoren vorzugsweise größer als 5% ist.

10 In einer Weiterbildung der Erfindung werden die Ortsverteilungen der Strahlungsintensität mit einem ortsauf lösenden Detektor für Alpha-, Beta-, Gamma- und/oder Röntgenstrahlung ermittelt.

In einer Weiterbildung der Erfindung werden die Ortsverteilungen der

15 Strahlungsintensität mit einem sogenannten Phosphor-Imager-Detektor ermittelt. Ein derartiger Phosphor-Imager-Detektor wird auch als Phosphorimager Imaging Plate oder Phosphorimager-IP bezeichnet. Der Phosphor-Imager-Detektor arbeitet vorzugsweise auf Basis von photo-stimulierter Lumineszenz. Vorteilhafterweise wird eine unterschiedliche

20 Empfindlichkeit eines zur Ermittlung einer Ortsverteilung der Strahlungsintensität der Trägerfläche verwendeten Phosphor-Imager-Detektors für den jeweils mengenspezifischen Strahlungstyp dadurch erzielt, dass der Phosphor des Phosphor-Imager-Detektors zusätzlich Atome mit hoher Ordnungszahl Z, insbesondere Blei, das beispielsweise in einer bleihaltigen Verbindung enthalten sein kann, und/oder Atome mit niedriger Ordnungszahl Z enthält. Wenn bei der Herstellung des Phosphor-Imager-Detektors Atome mit hoher bzw. niedriger Ordnungszahl Z in den Phosphor-Imager-Detektor eingebracht werden, erhöht bzw. erniedrigt sich dessen Nachweisempfindlichkeit beispielsweise für Gamma-

25

30 Strahlung. Das heißt, das Verhältnis der Empfindlichkeiten für verschiedene Strahlungstypen ändert sich. Dabei werden zusätzliche Atome eingebaut, die nicht für die Lichtspeicherung im Phosphor-Imager-Detektor notwendig sind, die Absorptionseffizienz des Phosphor-Imager-

Detektors aber verändern. Auf diese Weise kann zwischen Alpha-, Beta-, Gamma- und Neutronenstrahlung und Strahlung verschiedener Energie unterschieden werden. Insbesondere kann das Verhältnis der Empfindlichkeiten für Gamma-Strahlung zu dem für Beta-Strahlung, insbesondere für Beta-Strahlung mit Energien größer als 20 keV, die den Phosphormantel des Detektors durchdringen kann, verändert werden durch:

1) Einbau von Elementen mit hoher Ordnungszahl Z,
10 2) Einbau von Elementen mit niedrigem Ordnungszahl Z.

In einer Weiterbildung werden die erste Ortsverteilung der Strahlungsintensität der Trägerfläche durch einen ersten Phosphor-Imager-Detektor und die mindestens zweite Ortsverteilung der Strahlungsintensität der Trägerfläche durch einen mindestens zweiten Phosphor-Imager-Detektor gleichzeitig ermittelt, wobei die Empfindlichkeit des ersten Phosphor-Imager-Detektors und die Empfindlichkeit des mindestens zweiten Phosphor-Imager-Detektors für den jeweils mengenspezifischen Strahlungstyp unterschiedlich ist. Das heißt, bei der Messung werden mindestens zwei Phosphor-Imager-Detektoren bzw. Phosphorimager-IPs verwendet, die ein unterschiedliches Verhältnis der Empfindlichkeiten für die Strahlung der verschiedenen Punktstrahlungsobjekte besitzen. Dies ermöglicht, die Messungen bzw. die Ermittlungen der jeweiligen Strahlungsintensitäten kurz hintereinander bzw. gleichzeitig durchzuführen. Die unterschiedlichen Empfindlichkeiten der verschiedenen IP-Materialien ermöglichen die Berechnung der Ortsverteilung der jeweiligen Punktstrahlungsobjekte, selbst wenn kein ausreichender Unterschied durch den Zerfall der verwendeten Isotope entstanden ist. Selbstverständlich kann diese Vorgehensweise auch mit einer Wartezeit zwischen den Messungen kombiniert werden, um so zusätzlich einen Zerfall der Isotope zu nutzen.

In einer Weiterbildung der Erfindung werden der erste und der mindestens zweite Phosphor-Imager-Detektor an gegenüberliegenden Seiten der Trägerfläche angebracht. Hierbei werden unter Verwendung von Phosphorimager-IPs unterschiedlicher Empfindlichkeit zwei Messungen

5 gleichzeitig bzw. simultan an der Vorder- und Rückseite der zu messenden Proben bzw. Trägerflächen durchgeführt. Die unterschiedlichen Empfindlichkeiten der verschiedenen IP-Materialien ermöglicht es, daraus die Ortsverteilung der Punktstrahlungsobjekte zu berechnen.

10 In einer Weiterbildung der Erfindung werden die Ortsverteilungen der Strahlungsintensität mit einem sogenannten Flach-Detektor ermittelt. Derartige Flach-Detektoren oder Flat-Panel-Detectors ermöglichen die Anfertigung digitaler Röntgensofortbilder. Sie wandeln Röntgenstrahlen direkt in eine Matrix digital kodierter Pixel um, wodurch sich die Detektionseffizienz und die Auswertegeschwindigkeit erhöht.

15 Wenn der Veränderungsfaktor durch eine unterschiedliche Empfindlichkeit eines zur Ermittlung einer Ortsverteilung der Strahlungsintensität der Trägerfläche verwendeten Detektors für den jeweils mengenspezifischen Strahlungstyp realisiert werden soll, können beispielsweise ein Phosphor-Imager-Detektor und ein Flach-Detektor verwendet werden, um beispielsweise jeweils eine Messung der Ortsverteilung der Strahlungsintensität der Trägerfläche durchzuführen. Aus den mit den unterschiedlichen Detektoren gemessenen Ortsverteilungen kann die

20 25 Ortsverteilung der Punktstrahlungsobjekte einzeln berechnet werden.

In einer Weiterbildung der Erfindung wird die erste und die mindestens zweite Ortsverteilung der Strahlungsintensität mit einem gleichartigen Detektor ermittelt. Prinzipiell ermöglicht ein Detektor keine klare Diskriminierung zwischen unterschiedlichen Strahlungstypen, beispielsweise Betapartikeln oder Photonen, die beispielsweise von zwei verschiedenen Isotopen stammen, oder Strahlung von Isotopen mit unterschiedlichen Halbwertszeiten. Mit Hilfe des genannten Verfahrens ist unter Ver-

wendung desselben bzw. eines gleichartigen Detektors eine Multicolourmessung möglich, d.h. eine getrennte, überlagerungsfreie Messung der Ortsverteilung der einzelnen Typen von Punktstrahlungsquellen. Gleichartige Detektoren sind hierbei Detektoren desselben Typs oder

5 gleicher Bauart, die sich beispielsweise nicht oder nur unwesentlich in ihrer Empfindlichkeit für spezifische Strahlungstypen unterscheiden. Dies vereinfacht den Aufbau einer Analysevorrichtung und spart somit Kosten.

10 In einer Weiterbildung der Erfindung werden mindestens zwei zu analysierende Stoffe mit jeweils einer Menge von Punktstrahlungsobjekten markiert, die so markierten Stoffe gemischt und das Gemisch anschließend auf die Trägerfläche, insbesondere in Form eines flächenartigen Analysemittels, aufgetragen. Bei den zu

15 analysierenden Stoffen kann es sich vorteilhafterweise um Peptide, Proteine und/oder Oligonukleotide handeln, wobei beispielsweise eine erste und eine zweite Proteinprobe, die jeweils aus einer Vielzahl verschiedener Proteine bestehen können, mit jeweils unterschiedlichen Isotopen markiert werden. Nach der Markierung werden die Proteine der

20 beiden Proben gemischt und gemeinsam auf ein Analysemittel, insbesondere ein Proteingel, Nukleinsäure-Array, Protein-Array, ELISA-Array und/oder ein Blot aufgetragen. Auf dem Analysemittel erfolgt anschließend eine gemeinsame Auftrennung der zu analysierenden Stoffe bzw. Proteine der unterschiedlichen Proben anhand von

25 spezifischen Eigenschaften, die beispielsweise durch das Analysemittel bestimmt werden. Im Anschluss an die Auftrennung wird nun die Ortsverteilung der Punktstrahlungsobjekte für jede Menge von Punktstrahlungsobjekten einzeln durch das erfindungsgemäße Verfahren berechnet. Über die Ortsverteilung der spezifischen Punktstrah-30 lungsobjekte kann nun auf die Ortsverteilung der zu untersuchenden Proteine der jeweiligen Proben getrennt voneinander geschlossen werden.

Kurzbeschreibung der Zeichnungen

Vorteilhafte, nachfolgend beschriebene Ausführungsformen der Erfindung sind in den Zeichnungen dargestellt, in denen zeigen:

5 Fig. 1A mit einem Phosphorimager ermittelte Ortsverteilung der Strahlungsintensität eines mit Hilfe eines 2D-Gels aufgetrennten Gemisches aus 2 Proteinproben, wobei eine Probe mit Isotopen des Typ I-125 und die andere Probe mit Isotopen des Typs I-131 markiert wurde,

10 Fig. 1B mit dem Phosphorimager ermittelte Ortsverteilung der Strahlungsintensität des 2D-Gels von Fi.1A nach einer Wartezeit von 82 Tagen,

15 Fig. 1C mit Hilfe des erfindungsgemäßigen Verfahren berechnete Ortsverteilung der Strahlungsintensität der Proteinprobe, die mit I-sotopen des Typs I-125 markiert wurde,

20 Fig. 1D mit Hilfe des erfindungsgemäßigen Verfahren berechnete Ortsverteilung der Strahlungsintensität der Proteinprobe, die mit I-sotopen des Typs I-131 markiert wurde,

25 Fig. 1E Differenz der Ortsverteilungen von Fi.1C und Fig.1D, wobei die Proteinprobe, die mit Isotopen des Typs I-125 markiert wurde, blau und die Proteinprobe, die mit Isotopen des Typs I-131 markiert wurde, orange dargestellt ist,

30 Fig. 1F mit dem Phosphorimager ermittelte Ortsverteilung der Strahlungsintensität des 2D-Gels von Fi.1A nach einer Wartezeit von 23 Tagen,

Fig. 1G mit Hilfe des erfindungsgemäßigen Verfahren berechnete Ortsverteilung der Strahlungsintensität der Proteinprobe, die mit I-

sotopen des Typs I-125 markiert wurde, wobei zur Berechnung als zweite ermittelte Ortsverteilung die Ortsverteilung von Fig. 1F verwendet wurde,

5 Fig. 1H mit Hilfe des erfindungsgemäßen Verfahren berechnete Ortsverteilung der Strahlungsintensität der Proteinprobe, die mit I-sotopen des Typs I-131 markiert wurde, wobei zur Berechnung als zweite ermittelte Ortsverteilung die Ortsverteilung von Fig. 1F verwendet wurde,

10

Fig. 1I Differenz der Ortsverteilungen von Fig. 1G und Fig. 1H, wobei die Proteinprobe, die mit Isotopen des Typs I-125 markiert wurde, blau und die Proteinprobe, die mit Isotopen des Typs I-131 markiert wurde, orange dargestellt ist,

15

Fig. 2A mit einem Phosphorimager ermittelte Ortsverteilung der Strahlungsintensität von mit Isotopen des Typs I-125 und Isotopen des Typs I-131 markierten Proteinproben aus Rinderserumalbumin unterschiedlicher Verdünnungsstufen und Mischungsverhältnissen ohne Verwendung eines Absorbers,

20

Fig. 2B mit dem Phosphorimager ermittelte Ortsverteilung der Strahlungsintensität von Fig. 2A unter Verwendung eines Absorbers,

25 Fig. 2C mit Hilfe des erfindungsgemäßen Verfahren berechnete Ortsverteilung der Strahlungsintensität der Isotope des Typs I-125,

Fig. 2D mit Hilfe des erfindungsgemäßen Verfahren berechnete Ortsverteilung der Strahlungsintensität der Isotope des Typs I-131,

30

Fig. 2E Differenz der Ortsverteilungen von Fig. 2C und Fig. 2D, wobei die Isotope des Typs I-125 blau und die Isotope des Typs I-131 orange dargestellt sind.

Erste Ausführungsform

In einer ersten Ausführungsform der Erfindung werden zwei Proteinproben, die jeweils aus einer Vielzahl von unterschiedlichen Proteinen bestehen, mit jeweils unterschiedlichen Isotopen des Elements Jod markiert. Die erste Probe wird mit I-125, die zweite Probe mit I-131 markiert. Zur Kalibrierung der Masseskala werden spezielle Massenreferenzproteine mit I-125 markiert. I-125 weist eine Halbwertszeit von 60,14 Tagen auf und zerfällt durch Elektronenfang, wodurch Röntgenstrahlen und Gammastrahlen im Bereich von 27 keV bis 35 keV entstehen. I-131 weist eine Halbwertszeit von 8,06 Tagen auf und zerfällt durch die verschiedenen Mechanismen der Beta-Emission.

Die Proben werden anschließend gemischt und mit Hilfe eines 2D-Gels aufgetrennt. Zur Bestimmung der Veränderungsfaktoren werden auf der linken Seite des Gels Kalibrierungspunkte für beide Isotopentypen aufgebracht. Sie dienen zur Berechnung der Veränderungsfaktoren die bei der Berechnung der einzelnen Ortsverteilungen benötigt werden.

Nach der 2-dimensionalen Auftrennung, wird die Phosphorimager-IP während einer vorbestimmten Zeit mit der Probe bzw. der Strahlung der Probe beaufschlagt. Die Phosphorimager-IP ist sowohl für energiearme Röntgenstrahlen, Gammastrahlen und Betapartikel empfindlich. Die relativ hochenergetischen Photonen des I-131 Zerfalls werden von einer Phosphorimager-IP mit nur geringer Effizienz absorbiert bzw. detektiert. Die Phosphorimager-IP integriert die Strahlungsintensitäten beider Strahlungsquellen auf. Anschließend wird die Ortsverteilung der gespeicherten Strahlungsenergie der Phosphorimager-IP mit einem Lesegerät abgelesen und in eine Pixelmatrix bzw. ein Bild abgebildet, welche in Fig. 1A gezeigt ist. Die so ermittelte Ortsverteilung bzw. die Pixelmatrix enthält Anteile, die sowohl von I-125 als auch von I-131 stammen. Nach einer Wartezeit von 82 Tagen wird die Ortsverteilung der Probe wie o-

ben beschrieben erneut bestimmt. Diese Ortsverteilung ist in Fig. 1B gezeigt. Aufgrund der unterschiedlichen Halbwertszeiten der beiden Isotope hat die Strahlungsintensität bzw. die Aktivität von I-125 um einen Faktor von ca. zwei abgenommen. Im Gegensatz dazu beträgt die 5 Strahlungsintensität von dem auf dem Gel verbleibendem I-131 weniger als 1 % der ursprünglichen Strahlungsintensität. In Fig. 1B sind folglich fast ausschließlich Signalanteile von I-125 vorhanden.

Die unterschiedliche Veränderung der Strahlungsintensitäten wird in 10 dieser Ausführungsform ausschließlich durch die inhärenten Eigenschaften des unterschiedlichen radioaktiven Zerfalls der beiden Isotope, nicht jedoch durch einen Absorber bewirkt.

Anschließend wird anhand des erfindungsgemäßen Verfahrens die 15 Ortsverteilung der einzelnen Isotope getrennt berechnet. Zur Berechnung wurde die Intensität über einen Bereich von 4X4 benachbarten Pixeln herangezogen bzw. summiert, wobei ein Gauss-Filter verwendet wurde. Die Ausrichtung der ermittelten Ortsverteilungen zueinander erfolgt anhand von entsprechenden Referenzpunkten, die an jeweils gleichen Orten der Ortsverteilung vorhanden sind. Fig. 1C zeigt die berechnete Ortsverteilung der Strahlungsintensität bzw. der Isotopenmenge der Proteinprobe, die mit Isotopen des Typs I-125 markiert wurde und Fig. 1D zeigt die berechnete Ortsverteilung der Strahlungsintensität der Proteinprobe, die mit Isotopen des Typs I-131 markiert wurde. Fig. 1E 20 zeigt die Differenz der Ortsverteilungen von Fig. 1 C und Fig. 1 D, wobei die Proteinprobe, die mit Isotopen des Typs I-125 markiert wurde, blau und die Proteinprobe, die mit Isotopen des Typs I-131 markiert wurde, orange dargestellt sind. Schwarz bedeutet, dass eine gleiche Anzahl 25 beider Isotope vorhanden ist.

30

Die Ortsverteilung der Strahlungsintensität kann selbstverständlich auch ohne einen ortsauf lösenden Detektor bestimmt werden. Hierzu wird die zu untersuchende Trägerfläche durch geeignetes Auf trennen, beispiels-

weise Zerschneiden, in kleinere Stücke zerteilt und die Strahlungsintensität dieser Stücke durch einen herkömmlichen "Single-Source"-Detektor bestimmt. Die Bestimmung des Strahlungstyps und der Strahlungsintensität kann beispielsweise unter Verwendung von Gamma- und/oder Beta-Spektroskopie erfolgen.

Zweite Ausführungsform

10 In einer zweiten Ausführungsform der Erfindung, wird bei gleicher Vorgehensweise wie in der ersten Ausführungsform die Wartezeit zwischen der Ermittlung der ersten und der zweiten Ortsverteilung von 82 Tagen auf 23 Tage reduziert. Fig. 1F zeigt die mit dem Phosphorimager ermittelte Ortsverteilung der Strahlungsintensität des 2D-Gels von Fig. 1 A
15 nach einer Wartezeit von 23 Tagen. Durch den noch nicht vollständigen Zerfall von I-131 tragen nun beide Isotope zu der ermittelten Ortsverteilung bei. Die Veränderungsfaktoren sind folglich für beide Isotope wesentlich größer als 0 %. Gleichermaßen ist das Verhältnis der Veränderungsfaktoren wesentlich größer als 0%.

20 Fig. 1G zeigt die mit Hilfe des erfindungsgemäßen Verfahren berechnete Ortsverteilung der Strahlungsintensität der Proteinprobe, die mit Isotopen des Typs I-125 markiert wurde, Fig. 1H zeigt die analog berechnete Ortsverteilung der Strahlungsintensität der Proteinprobe, die mit Isotopen des Typs I-131 markiert wurde, wobei zur Berechnung in beiden Fällen als zweite ermittelte Ortsverteilung die Ortsverteilung von Fig. 1F verwendet wurde.

30 Fig. 1I zeigt die Differenz der Ortsverteilungen von Fig. 1G und Fig. 1H, wobei die Proteinprobe, die mit Isotopen des Typs I-125 markiert wurde, blau und die Proteinprobe, die mit Isotopen des Typs I-131 markiert wurde, orange dargestellt ist. Schwarz bedeutet, dass eine gleiche Anzahl beider Isotope vorhanden ist.

Die Ergebnisse dieser Ausführungsform decken sich mit den Ergebnissen der Ausführungsform 1, die aufgrund der fast vollständigen Unterdrückung von I-131 als Referenzergebnisse dienen können. Das erfundensgemäße Verfahren liefert folglich zuverlässige Messergebnisse selbst dann, wenn bei der Ermittlung der zweiten Ortsverteilung ein Strahlungstyp nicht vollständig unterdrückt ist.

10 Dritte Ausführungsform

In dieser Ausführungsform der Erfindung wird ein Absorber verwendet, um die entsprechenden Veränderungsfaktoren zu realisieren, d.h. um differentielle Messungen der die zwei Isotope I-125 und I-131 enthaltenden Probe vorzunehmen. Es wird analog zur ersten Ausführungsform der Erfindung ein zweidimensionales Gel hergestellt, das die mit den zwei Isotopen I-125 und I-131 markierten Proteine enthält. Die Phosphorimager-IP wird während einer vorbestimmten Zeit der Ortsverteilung der Strahlungsintensität des 2D-Gels ausgesetzt. Anschließend wird die Phosphorimager-IP durch das Phosphorimagerauslesegerät abgelesen. Die Strahlungsintensität über der Fläche des 2D-Gels wird in einer Matrix abgebildet, wobei die Werte der einzelnen Elemente der Matrix bzw. der Pixel die Strahlungsintensität des zugeordneten Bereichs auf der Phosphorimager-IP abbilden. Es entsteht eine Matrix bzw. ein Bild, dessen Signalanteile sowohl von I-125 als auch von I-131 herrühren.

Um die Signalanteile zu separieren ist es notwendig, die Intensität eines Strahlungstyps durch geeignete Mittel zu verändern bzw. zu reduzieren und ein zweites Bild bzw. eine zweite Ortsverteilung zu ermitteln.

30

Durch Einbringen eines Absorbers bekannter Dicke zwischen die Probe und die Phosphorimager-IP während der Bestrahlung kann die Strahlungsintensität selektiv für jeden Strahlungstyp mit unterschiedlichen

Veränderungsfaktoren reduziert werden. Ein derartiger Absorber kann aus Metall, Metalllegierung, Kunststoff, Plexiglas, Teflon oder einem anderen geeigneten Material bestehen. Der Absorber muss, um die erfindungsgemäße Funktion zu erzielen, den von den Strahlungsquellen e-
5 mittierten Strahlungstyp (in dieser Ausführungsform Photonen von I-125 und Beta-Partikel von I-131), der das Signal auf dem Detektor erzeugt, mit jeweils unterschiedlichen Veränderungsfaktoren absorbieren.

Bei dieser Ausführungsform kann mit Hilfe des Absorbers die Intensität
10 des von I-131 stammenden Signals relativ zum Signal von I-125 signifikant verringert werden. Zu diesem Zweck sind Absorber aus Elementen mit niedriger Atomzahl effektiver (Beispiel: Aluminiumfolie, dünnes Plexiglas usw.). Die Absorberdicke spielt bei der Absorptionseffizienz eine Schlüsselrolle.

15 Das Ermitteln der ersten und der mindestens zweiten Ortsverteilung der Strahlungsintensität kann mit Hilfe einer "sandwichartigen" Anordnung aus Phosphorimager-IP, Gel, Absorber, Phosphorimager-IP gleichzeitig erfolgen. Alternativ könnten die Bilder nacheinander, mit oder ohne Absorber gemacht werden, was bei der Erfindung bevorzugt wird. Offensichtlich können auch andere radioaktive Isotope für die hier offenbarte Erfindung verwendet werden.

25 **Vierte Ausführungsform**

In einer vierten Ausführungsform der Erfindung wird, wie in der dritten Ausführungsform, ein Absorber verwendet, um die Strahlungsintensität der unterschiedlichen Strahlungstypen unterschiedlich zu verändern.

30 In dieser Ausführungsform werden zwei Proben aus Rinderserumalbumin einmal mit I-125 und einmal mit I-131 markiert. Die Proben werden jeweils vier Mal in 10-er-Stufen verdünnt. Es entstehen also von jeder

Probe jeweils 5 Verdünnungsstufen, von unverdünnt bis auf 1/10000 verdünnt. Die Strahlungsintensitäten unterscheiden sich folglich um den Faktor 10000. Jede Verdünnungsstufe der ersten Probe wird mit jeder Verdünnungsstufe der zweiten Probe gemischt. Es entstehen so insgesamt 25 Proben mit unterschiedlichen Mischungsverhältnissen, die jeweils in einem Volumen von 1 μ l auf ein quadratisches Filterpapier von 3mm Seitenlänge aufgetragen werden. Die Filterpapiere werden in einer Matrixanordnung auf einem flächigen Träger angeordnet. Die Konzentration von I-125 nimmt von unten nach oben ab. Die Konzentration von I-131 nimmt von links nach rechts ab.

Eine Phosphorimager-IP wird während 24 Stunden mit der Strahlung des flächigen Trägers beaufschlagt. Die Phosphorimager-IP integriert die Strahlungsintensitäten beider Strahlungsquellen der Proben auf. Anschließend wird die Ortsverteilung der gespeicherten Strahlungsenergie der Phosphorimager-IP mit einem Lesegerät abgelesen und in eine Pixelmatrix bzw. ein Bild abgebildet, welche in Fig. 2A gezeigt ist. Die so ermittelte Ortsverteilung bzw. die Pixelmatrix enthält Anteile, die sowohl von I-125 als auch von I-131 stammen. Direkt nach der Ermittlung dieser ersten Ortsverteilung wird eine zweite Ortsverteilung ermittelt, wobei ein Absorber zwischen dem flächigen Träger und der Phosphorimager-IP angeordnet wird. Diese zweite Ortsverteilung ist in Fig. 2B gezeigt. Der Absorber besteht aus einer 900 μ m dicken Plastiksicht. Die Strahlungsintensitäten der auf dem flächigen Träger angeordneten Proben wurden für beide ermittelten Ortsverteilungen unter Verwendung der gleichen Bereiche aufintegriert bzw. aufsummiert. Auf Basis dieser integrierten Strahlungsintensitäten wird aus den beiden ermittelten Ortsverteilungen mit Hilfe des erfindungsgemäßen Verfahrens die Ortsverteilung der einzelnen Isotope getrennt berechnet. Fig. 2C zeigt die berechnete Ortsverteilung der Strahlungsintensität bzw. der Isotopenmenge der Proteinproben, die mit Isotopen des Typs I-125 markiert wurden und Fig. 2D zeigt die berechnete Ortsverteilung der Strahlungsintensität der Proteinproben, die mit Isotopen des Typs I-131 markiert wurden. Fig. 2E zeigt

die Differenz der Ortsverteilungen von Fig. 2C und Fig. 2D, wobei die Proteinproben, die mit Isotopen des Typs I-125 markiert wurden, blau und die Proteinproben, die mit Isotopen des Typs I-131 markiert wurden, orange dargestellt sind. Schwarz bedeutet, dass eine gleiche Anzahl 5 beider Isotope vorhanden ist.

Die unverdünnte, mit I-125 markierte Probe unten rechts und die unverdünnte, mit I-131 markierte Probe oben links wurden verwendet, um die Zerfallskonstanten zu berechnen, die zur Berechnung der Ortsverteilun-10 gen benötigt werden.

Das berechnete Ergebnis stimmt in engen Fehlergrenzen mit dem theo-15 retisch zu erwartenden Ergebnis überein. Dies zeigt, dass das erfin-
dungsgemäße Verfahren auch bei Veränderungsfaktoren, die deutlich über 0% liegen, funktioniert.

Mögliche Variationen der Ausführungsformen

20 Bei den obigen Ausführungsformen der Erfindung werden Analysatmo-
leküle (Proteine) mit chemisch identischen Radioisotopen (radioaktivem Iod) markiert. Dieses Verfahren ist äußerst nützlich zur Durchführung differenzierter Analysen, weil die Unterschiede der Intensitätsverteilung der Strahlung zwischen den beiden Proben durch Unterschiede zwis-25 chen den Proben selbst bedingt sind. Dies gilt auch für beispielsweise mit P-33 und P-32 markierte Proteine.

Mit einer Kombination von mit C-14, S-35 oder P-33 markierte Proteine erzeugen unterschiedliche 2D-PAGE-Bilder, weil Kohlenstoff, Schwefel 30 und Phosphat jeweils in unterschiedlicher Chemie in den Proteinen vor-
handen ist. So haben einige Proteine kein Cystein oder Methionin und tragen deshalb keinen Schwefel, und werden doch durch eine Kinase phosphoryliert, so dass sie effizient Phosphat tragen. Andere Proteine

können viele schwefelhaltige Aminosäuren aufweisen, und doch nicht phosphoryliert werden. Trotzdem ist die vorliegende Erfindung auch geeignet, die synthetischen Bilder zu extrahieren, die der Verteilung beider Isotopen entsprechen, wenn eine Kombination dieser Isotopen erfundensgemäß verwendet wird. Tatsächlich ist die Erfindung auf die differentielle Messung jeglicher Radioisotope anwendbar, die auf einer Oberfläche oder einer ähnlichen Fläche verteilt sind, auch solche mit unterschiedlichen Oberflächenstrukturen, die für Phosphorimageranalyse geeignet sind.

10

Die für die Erfindung geeigneten radioaktiven Isotope weisen signifikante Unterschiede in der Zerfallsrate, der Energie emittierter Partikel, der Art der emittierten Partikel oder einer Kombination davon auf. Eine hohe Isotopenreinheit ist wünschenswert, aber nicht notwendig.

15

Eine hohe chemische Reinheit der Radioisotope ist wünschenswert, aber nicht notwendig. Es ist möglich, die Erfindung auf Proben anzuwenden, die mit verschiedenen Mischungen von Isotopen markiert sind, wie z.B. die Markierung einer Probe mit 95 % I-131, 5 % I-125 und Markierung der anderen Probe mit 5 % I-131, 95 % I-125. Die Markierungsmischung kann offensichtlich recht komplex sein, ohne von der Idee oder dem Rahmen der Erfindung abzuweichen, und könnte beispielsweise Spurenmengen vieler Isotope enthalten, von denen einige nicht kovalent in die Analysatmoleküle eingebracht werden, wie K-40.

25

Die vorliegende Erfindung ist unabhängig vom Verfahren des Einbringens radioaktiver Isotope in die Analysatmoleküle. Beispielsweise können Proteine durch metabolische Aufnahme, durch Radioiodation postharvest, durch Alkylierung mit radioaktiven Reagenzien (jeglicher Chemie) oder durch andere Verfahren markiert werden.

Eine andere Anwendung von Phosphorimagern ist die Messung von DNA und Nukleinsäurearrays. In solchen Anwendungen, wie der Häufig-

keitsanalyse von mRNA, können P-33, P-32, S-35, C-14, H-3 und andere Isotope alle auf herkömmliche Art in Hybridisierungsmoleküle eingebracht werden. Durch die Prinzipien der Erfindung kann ein Phosphorimager verwendet werden, um Zweifarbenanalysen dieser Systeme

5 durchzuführen. Wegen der einfachen Chemie von DNA-artigen Polymeren, können die Starhlungsintensitäten von Hybridisierungsmolekülen, die diese Radioisotope enthalten, alle identisch sein, wenn dieselbe Probe unabhängig markiert und für jedes Isotop gemessen wird. Die oben beschriebenen Prinzipien gelten offensichtlich auch für Proteinarrays oder alle anderen Arrays oder semiplanaren Verteilungen von Analytarmolekülen, die für Phosphorimageranalyse geeignet sind.

10

Es ist erkennbar, dass Anwendungen der Erfindung im Bereich der medizinischen Bildgebung implementiert werden können, wo zwei oder

15 mehr differentielle Bilder erzeugt werden, um synthetische Bilder von zwei oder mehr Signalquellen zu extrahieren. Ein Beispiel könnte den Nachweis gewisser radioaktiver Spurenelemente kombiniert mit Röntgen des Körpers unter Verwendung geeigneter Absorber gemäss der Erfindung betreffen, und im Bereich der Medizin von großem Vorteil sein.

20

Offensichtlich ist die vorliegende Erfindung nicht auf Phosphorimager-IP und nicht auf radioaktive Messungen beschränkt. Die Erfindung kann auch auf Fälle angewendet werden, bei denen sichtbares Licht und nicht Radioaktivität mehrfach gemessen wird und beide Signalanteile algorithmisch extrahiert werden. Beispielsweise kann eine Enzymreaktion Licht ähnlicher Wellenlänge produzieren wie jenes, das von einem fluorophoren oder lumineszenten Molekül emittiert wird. Indem die Intensitätsverteilung des Lichts ermittelt wird, das durch die chemische Reaktion und das Fluorophor gemeinsam emittiert wird, und die Intensitätsverteilung des Lichts, das durch das Fluorophor emittiert wird, nachdem die enzymatische Reaktion eine reduzierte Lichtmenge produziert, können die Beiträge des fluoreszent und enzymatisch produzierten Lichts im ursprünglichen Bild bestimmt werden. Bei dieser Implementierung ist wich-

25

30

tig, dass die Reduktion der Intensität beider Lichtquellen bekannt ist oder genau kalibriert werden kann.

Alle in dieser Offenbarung zitierten Publikationen und Patentanmeldungen werden durch Bezugnahme zum Bestandteil der Offenbarung der Erfindung gemacht.

Terminologie, Material und Methoden

10

Nachfolgend wird die verwendete Terminologie erläutert und eine Übersicht über die herkömmlichen Materialien und Methoden gegeben.

15 Ein Bild wird durch eine Matrix dargestellt, wobei die Matrixzellenwerte beispielsweise der Intensität eines Signals entsprechen, das durch einen Detektor an einem entsprechenden Ort auf der abgebildeten Oberfläche erfasst wird. Die Bilder können in den üblichen Dateiformaten für Bilder gespeichert werden.

20 Unter einer Mehrfarbenanalyse ist zu verstehen, dass mehrere Proben jeweils separat markiert, vermischt und gemeinsam separiert werden. Die Auswertung erfolgt dann für jede Probe einzeln, unbeeinflusst von der Existenz der jeweils anderen Proben. Es gibt verschiedene Verfahren, um Mehrfarbengleichungen zu erzeugen.

25

Genomik bedeutet die quantitative Untersuchung von Nukleinsäuren oder nukleinsäureähnlichen Polymeren.

30 Proteomik wurde definiert als die Untersuchung aller Proteine, die durch die Genome der untersuchten Zellen exprimiert werden. Das Akronym PROTEOM bedeutete PROTEine, die von einem GenOM exprimiert werden.

Wasinger VC, Cordwell SJ, Cerpa-Poljak A, Yan JX, Gooley AA, Wilkins MR, Duncan MW, Harris R, Williams KL, Humphery-Smith I. (1995) Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. Electrophoresis, 16, 1090-4.

5

Hier bedeutet Proteomik speziell die Untersuchung von Molekülen, bei denen mindestens ein Teil in ein Ribosom (ein Protein) translatiert wurde, wie es Fachleuten bekannt ist, oder eine Gruppe solcher Proteine. Proteomik umfasst auch die Untersuchung von posttranslationalen Proteinmodifikationen, Proteinsynthese und Abbauraten, Proteinabbauprodukte und Kombinationen davon.

Hier bezieht sich Molekularprofil oder Profil eines biologischen Systems, wie einer Zelle, einer Gruppe von Zellen, einem Gewebe oder einem Organismus, auf ein Muster von Änderungen in der Genexpression oder Proteinexpression oder Lipidzusammensetzung oder Metabolitenproduktion von kleinen Molekülen oder Temperatur oder Metabolitensekretion von kleinen Molekülen, Änderungen in Zuckerhäufigkeit oder -typen, oder Änderungen in posttranslationalen Proteinmodifikationen, oder Änderungen in der Proteinproteolyse, oder Änderungen in der Ionensekretion durch ein oder mehrere Zellabteile, oder in der Ionenaufnahme durch ein oder mehrere Zellabteile zwischen zwei oder mehr untersuchten biologischen Systemen. Allgemeiner ausgedrückt ist das Molekularprofil eines biologischen Systems ein Mass für die Atome, die dieses System bilden, und insbesondere ihrer chemischen, räumlichen und zeitlichen Beziehungen zueinander.

Array bedeutet eine geordnete Platzierung oder Anordnung. Der Begriff wird hier verwendet, um eine geordnete Platzierung von Oligonukleiden (einschliesslich RNA, cDNA und genomicscher DNA) oder von Liganden für Analysatmoleküle, wie Affinitätsreagenzien für Proteine, Lipide und Zucker oder Moleküle, die solche funktionellen Gruppen enthalten (z. B. enthält ein Glycoprotein mindestens eine Zuckergruppe oder z. B. ent-

hält ein Lipoprotein mindestens eine Lipidgruppe) zu bezeichnen. Die angeordneten Moleküle sind auf einer Oberfläche positioniert, beispielsweise einem Chip, und werden verwendet, um komplementäre Oligonukleotide einzufangen (einschliesslich RNA, cDNA und genomische 5 DNA) oder Substrate für den Liganden. Da das Oligonukleotid oder der Ligand in jeder Position in der Anordnung bekannt ist, kann die Sequenz (einer Nukleinsäure) oder eine physikalische Eigenschaft (eines Proteins) durch die Position, in der die Nukleinsäure oder das Substrat an das Array binden, bestimmt werden.

10

Proteinseparationsverfahren

Die Anwendung der Elektrophorese für präparative Zwecke ist eine etablierte Technik und es gibt verschiedene Typen von Elektrophoresegeräten für präparative und analytische Zwecke. Diese Geräte und ihre begleitenden Prinzipien können in drei Kategorien eingeteilt werden.

Andrews AT. (1986) Electrophoresis: Theory, Techniques, and Biochemical and Clinical Applications. Oxford University Press.

Westermeier R. (1977) Electrophoresis in Practice: A Guide to Methods and Applications of DNA and Protein Separations. John Wiley and Sons, Weinheim.

25 a) Zonenelektrophorese
 b) Isotachophorese
 c) Isoelektrisches Fokussieren

Isotachophorese verwendet hydrophile Matrices und zeigt typischerweise hohe Auflösung, aber geringe Ladekapazitäten. In Kombination mit freier Elektrophorese kann das Verfahren für mikropräparative Zwecke angewendet werden.

Weber G, Bocek P. (1998) Stability of continuous flow electrophoresis. Electrophoresis, 19, 3094-3905.

Isoelektrisches Fokussieren (IEF, isoelectric focussing) wird entweder in

5 Flüssigkeitsdichtegradienten, in Gelgradienten oder in Mehrkammergeräten durchgeführt, mit einem Separationsgelmedium auf Basis von IEF-
Immobilin.

Righetti PG. (1990) Immobilized pH gradients: theory and methodology.

10 In: Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology. Bd. 20 (Hrsg. RH Burdon, PH Knippenberg). S. 397. Elsevier, Amsterdam.

Righetti PG, Bossi A, Wenisch E, Orsini G. (1997) Protein purification in multicomponent electrolyzers with isoelectric membranes. J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl., 699, 105-15.

15

Zonenelektrophorese umfasst Glycin, Bicin und Tricin gepufferte SDS-PAGE (sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis) Proteiningsysteme, die üblicherweise in der Proteinanalyse verwendet werden und in den oben genannten Literaturzitaten diskutiert werden.

20

Derzeitige Proteomiktechniken umfassen üblicherweise die Verwendung von 2D-PAGE (zweidimensionaler Polyacrylamidgelektrophorese), wodurch Proteine zunächst durch Unterschiede im pI durch IEF in der ersten Dimension getrennt werden. Diese Proteine werden dann anschliessend durch das Molekulargewicht in einem SDS-PAGE-Gel in der zweiten Dimension getrennt.

Während 2D-PAGE derzeit das Verfahren ist, das die höchste Trennleistung für biochemische Reinigungen ergibt, übersteigt die Zahl der Proteine und ihrer modifizierten Isoformen, die in eukaryotischen Zellen, Geweben und Organismen vorhanden sind, die Trennkapazität des besten 2D-PAGE-Systems. Die Häufigkeiten verschiedener Proteine und Proteinoisoformen in komplexen eukaryotischen Zellen, Geweben und Orga-

nismen schwankt auch stark. Die häufigsten Proteine in einer eukaryotischen Zellen können mit mehr als 10^8 Kopien pro Zelle vorhanden. Beispiele häufiger Proteine umfassen bestimmte Cytoskelettpoteine oder Albumin in Leber und Blutserum. Einige Proteine können signifikante 5 biologische Effekte ausüben, wenn sie in sehr geringen Mengen vorhanden sind, vielleicht nur mit ein paar Molekülen pro Zelle. Obwohl die geringste Menge, bei der Proteine biologische Aktivität ausüben können, kaum verstanden ist, könnte diese Kategorie Beispiele umfassen wie Telomerase und DNA-Polymerase bei der Progression von präkanzerösen bis kanzerösen Zellen. Andere Fälle, wenn Moleküle geringer Häufigkeit in Proteinmischungen biologisch relevant sind, sind im Blut, wo ein paar Moleküle Cytokin pro Liter von Bedeutung sein können oder Knochenmark, wo nur eine Metastasenkrebszelle unter Billionen anderer Zellen fatale biologische Konsequenzen für den Patienten haben kann. 10 15 Zur Diskussion der Anzahl von Proteinen und Proteinisoformen, die in eukaryotischen Zellen zu erwarten sind, und einige Implikationen für 2D-PAGE in Proteomik siehe Vuong et al.

Vuong GL, Weiss SM, Kammer W, Priemer M, Vingron M, Nordheim A, 20 Cahill MA. Improved sensitivity proteomics by post harvest alkylation and radioactive labelling of proteins. 2000, Electrophoresis 21: 2594-2605.

Die Reproduzierbarkeit von 2D-PAGE ist auch notorisch gering, so dass 25 typischerweise mehrere Replikate jedes Gels erforderlich sind, um mit Softwarepaketen eine mittlere Näherung der Zusammensetzung des typischen 2D-PAGE-Musters des untersuchten Systems zusammenzustellen. Es sind einige Softwarepakete im Handel erhältlich. Eine wichtige Anwendung proteomischer Studien ist, den Unterschied in der Häufigkeit 30 bestimmter Proteine oder Proteinisoformen zwischen zwei oder mehr experimentell interessanten Regimen zu bestimmen, wie Proteinen von Kontrollzellen, Geweben oder Organismen, im Vergleich zu entspre-

chenden Häufigkeiten aus pharmakologisch behandelten Zellen, Gewebe-
nen oder Organismen.

Eine Reihe anderer Verfahren sind zur Proteintrennung verfügbar, die
5 ohne darauf beschränkt zu sein Hochdruckflüssigkeitschromatographie, Dünnschichtchromatographie, FPLC, Gelfiltrationschromatographie, Ionen-
austauschchromatographie, Mikrofluidsysteme wie Kapillare-
lektrophorese und auf Chips gestützte Mikrofluidik, Affinitätsreagenzien
mit Mikroaffinitätsarrays und Elektrophorese umfassen. Die folgenden
10 Literaturstellen beschreiben den Stand der Technik von Trennverfahren,
die in der Proteomikforschung eingesetzt werden.

Daniel C. Liebler. *Introduction to Proteomics: Tools for the New Biology*.
300 Seiten 1. Aufl. (Nov. 2001) Humana Press; ISBN: 0896039927.

15 Timothy Palzkill. *Proteomics*. 1. Aufl. (15. Nov. 2001) Kluwer Academic
Publishers; ISBN 0792375653.

MJ Dunn (Hrsg.) *Proteomics Reviews 2001*. (April 2001) VCH Verlags-
ges. mbH; ISBN: 3527303146.

Andre Schrattenholz (Hrsg.). *Methoden der Proteomforschung. Moleku-
20 lare Analyse der Proteinexpression*. 2001. Spektrum Akademische Ver-
lag, Heidelberg. ISBN: 382741153X.

Issaq HJ. *The role of separation science in proteomics research*. Elec-
trophoresis 2001, 22:3629-3638.

25 Figeys D, Pinto D. *Proteomics on a chip: promising developments*. Elec-
trophoresis 2001, 22:208-16.

Blagoev B, Pandey A. *Microarrays go live – new prospects for pro-
teomics*. Trends Biochem. Sci. 2001, 26:639-641.

Cahill DJ. *Protein and antibody arrays and their medical applications*. J
Immunol Methods 2001, 250:81-91.

30 Paweletz CP, Charboneau L, Bichsel VE, Simone NL, Chen T, Gillespie
JW, Emmert-Buck MR, Roth MJ, Petricoin III EF, Liotta LA. *Reverse
phase protein microarrays which capture disease progression show acti-*

vation of pro-survival pathways at the cancer invasion front. *Oncogene* 2001, 20:1981-1989.

Figeys D, Pinto D. Proteomics on a chip: promising developments. *Electrophoresis* 2001, 22:208-16.

5 Miklos GL, Maleszka R. Protein functions and biological contexts. *Proteomics* 2001, 1:169-178.

Lodish H, Berk A, Zipursky LS, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J. *Molecular Cell Biology*, 4. Aufl. W.H. Freeman, New York, ISBN:0-7167-3136-31986.

10 Patterson SD. Proteomics: the industrialization of protein chemistry. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2000 11:413-418.

Proteinnachweis in der Proteomik

Proteine können durch eine Vielzahl von Verfahren nachgewiesen werden, die in den obigen Literaturstellen beschrieben sind, welche, ohne darauf beschränkt zu sein, umfassen:

- 5 1) Verbindung von Farbstoffen oder Anfärzbemitteln wie Amido-
midschwarz, Sulforhodamin B, Agalmaschwarz oder verschiedene
Silberanfärbeverfahren (obige Literaturzitate).
- 10 2) Spektroskopischer Nachweis von aromatischen Aminosäuren oder
Peptidbindungen.
- 3) Nichtkovalente Assoziation von Fluoreszenzreagenzien.
- 15 4) Kovalente Bindung von Fluoreszenzreagenzien, wie Monobrom-
bimanthiolyt, Naphthalen-2,7-disulfonsäure, Fluorescen, Cye-
Farbstoffderivate oder eine Reihe anderer Reagenzien, die den
Fachleuten bekannt sind. Das Einbringen von fluoreszierenden
Gruppen in Proteinmoleküle kann z. B. durch Alkylierung von A-
minogruppen wie Lysin oder der Aminoendgruppe, durch Alkylierung
20 von Cysteingruppen oder durch andere Verfahren erreicht
werden.
- 25 5) Metabolisches Einbringen von radioaktiven Isotopen, darunter H-
3, C-14, S-35, P-32 und P-33 gefolgt von radioaktivem Nachweis.
- 6) Radioaktive Markierung postharvest, wie Proteiniodierung (Vuong
et al, siehe oben und dort genannte Zitate), gefolgt von radioakti-
vem Nachweis.
- 30 7) Immunnachweis, wo Antikörper oder rekombinant produzierte Af-
finitätsmoleküle spezifisch mit interessierenden Proteinen in
Wechselwirkung treten, nach einer Reihe von Standardprotokol-
len, wie sie bei Harlow und Lane, Antibodies, A Laboratory Manual
(Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbour, NY, 1988)
gelehrt werden oder wie sie bei Hudson und Souriau, Expert Opin.
Biol. Ther. 1: 845-855 (2001) und bei Manoutcharian et al., Curr.
Pharm. Biotechnol. 2: 217-223 (2001) erwähnt sind. Antikörper

können mit radioaktiven Molekülen radiomarkiert werden oder kovalent gebunden werden, was ihren Nachweis mit radioaktiven Detektoren erlaubt, wie es bei Manoutcharian et al. oben beschrieben ist.

5 8) Markieren (tagging) ist eine andere Art, Veränderung in der Proteinexpression nachzuweisen und zu bestimmen. Beispielsweise kann das Gen, das für das Protein kodiert, technisch hergestellt (engineered) werden, um ein Hybridprotein zu produzieren, das eine nachweisbare Markierung (tag) enthält, so dass das Protein

10 durch Erkennen der Markierung spezifisch nachgewiesen werden kann. Es sind Systeme erhältlich, die die direkte Bildgebung und quantitative Analyse von radioaktiven Markierungen erlauben, z. B. in Gelen, auf denen Proteine aufgetrennt wurden. Es können Unterschiede in der Expression durch Erkennen von Unterschieden in der Menge der vorhandenen Markierung in Test- und Kontrollproben bestimmt werden.

15

In Fällen, wo Probenmaterial äusserst beschränkt ist, wie bei gewissen Biopsie- oder Asservationsmethoden zur Gewebegewinnung aus Patienten 20 in klinischen Situationen, oder wo die Untersuchung Nachweis der Analyt moleküle mit der geringsten Häufigkeit umfassen sollte, sind die empfindlichsten Nachweisverfahren höchst wünschenswert. Von den oben genannten Verfahren ist der Nachweis von radioisotopmarkierten Proteinen durch geeignete Detektoren um mehrere Grössenordnungen 25 empfindlicher als irgendein anderes Verfahren und deshalb das Mittel der Wahl.

Bildanalysensoftware

30

Es existieren einige aufwändige Softwarepakete für die Verarbeitung von graphischen oder digitalen Daten, die aus biologischen Studien erhalten sind, wie Proteingelanalyse oder Nukleinsäurearrayanalyse. Bei-

spiele für Proteomanalyse umfassen die Produkte Phoretix 2C von Non-Linear Dynamics (Newcastle upon Tyne, UK), Delta 2D von Decodon GmbH (Greifswald, Deutschland), 3Z von Compugen (Tel-Aviv, Israel), Gellab II+ von Scanalytics (Faifax, VA), Biolimage von Genomic Solutions (Ann Arbor, MI), Melanie 3 von GeneBio (Genf), das Programm Keppler von Large Scale Biology Corporation (Vacaville, CA), der Java-fähige Browser des Programms CAROL (Freie Universität, Berlin), der Gelbildkomparator Flicker 2D gel image comparator (Lemkin PF. Comparing two-dimensional electrophoretic gel images across the Internet.

5 10 Electrophoresis, 18:461-470 (1997) und Bildanalyseprodukte, die von Amersham Biosciences (Freiburg, Deutschland) verkauft werden.

Proteinidentifikation in der Proteomik

15 Massenspektrometrie gewinnt in der Proteomik zunehmend Bedeutung, nicht nur zur Identifizierung von Proteinen, die durch 2D-PAGE getrennt wurden, sondern auch für den Direknachweis und die relative Quantifizierung von Proteinen unabhängig von 2D-PAGE. Andere Verfahren zur

20 Proteinidentifizierung umfassen Edman-Abbau, Aminosäureanalyse und andere Verfahren, die den Fachleuten bekannt sind. Viele dieser Verfahren beinhalten das Erfassen von Daten aus dem untersuchten Protein und Vergleich dieser Parameter mit einer Liste von Parametern, die durch theoretische Analyse von Nukleinsäure- und Proteindatenbanken

25 vorhergesagt sind.

Anderson NL, Matheson AD, Steiner S. Proteomics: applications in basic and applied biology. Curr. Opin. Biotechnol. 2000, 11:408-412.

Gygi SP, Aebersold R. Mass spectrometry and proteomics. Curr. Opin.

30 Chem. Biol. 2000, 4:489-494.

Lee KH. Proteomics: a technology-driven and technology-limited discovery science. Trends Biotechnol. 2001 Jun; 19(6):217-222.

Patterson SD. Proteomics: the industrialization of protein chemistry. Curr. Opin. Biotechnol 2000, 11:413-418.

Godovac-Zimmermann J, Brown LR. Perspectives for mass spectrometry and functional proteomics. Mass Spectrom. Rev. 2001, 2001, 20:1-5 57.

P. James (Hrsg.) Proteome Research: Mass Spectrometry (Principles and Practice) 235 Seiten (Dez. 2000) Springer Verlag; ISBN: 3540672567.

10

Genomik

Es sind im Stand der Technik eine Reihe von Verfahren zum Nachweisen und Vergleichen der Ausprägung der Genexpression bei Zellen, Organismen oder Viren oder anderer transkriptionsaktiver Systeme bekannt. 15

Ein Standardverfahren für solche Vergleiche ist der Northern Blot. Bei dieser Technik wird RNA aus der Probe extrahiert und auf eine Reihe 20 von für die RNA-Analyse geeigneten Gelen aufgebracht, die dann zur Auftrennung der RNA nach der Grösse durchgeführt werden.

Sambrook, J. et al., 1989. Molecular Cloning, A Laboratory Manual. Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY. 2. Aufl.

25

Die Gele werden dann geblottet (wie oben bei Sambrook beschrieben) und auf Proben für interessierende RNAs hybridisiert. Die Proben können radioaktiv oder nicht radioaktiv sein. Beispielsweise kann Hybridisierung mit der Probe durch Chemilumineszenznachweis der gebundenen 30 Proben mit dem Genius System (Boehringer Mannheim Corporation, Mannheim, Deutschland) gemäss den Angaben des Herstellers betrachtet und analysiert werden. Es kann eine gleiche Beladung der RNA in den Bahnen beispielsweise durch Anfärben der Ribosomen-RNA-

Banden mit Ethidiumbromid bewertet werden. Alternativ können die Proben radiomarkiert und autoradiographisch mit einer Probe für ein Gen und einem photographischen Film oder einem Phosphorimager oder gemäss der vorliegenden Erfindung mit Proben für mehr als ein Gen 5 nachgewiesen werden.

Die RNA kann durch eine Reihe von Methoden verstärkt und dann nachgewiesen werden. Beispielsweise offenbart Marshall, US-Patent Nr. 5,686,272 die Verstärkung von RNA-Sequenzen mit der Ligaseketten-10 reaktion LCR (ligase chain reaction). LCR ist von Landegren et al., Science, 241: 1077-1080 (1988); Wu et al., Genomics, 4: 560-569 (1989); Barany, in PCR Methods and Application, 1:5-16 (1991); und Barany, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 189-193 (1991) beschrieben. Auch kann die RNA durch Reverstranskription in komplementäre DNA 15 (cDNA) umgewandelt und dann durch LCR, Polymerasekettenreaktion (PCR, polymerase chain reaction) oder andere Verfahren verstärkt werden. Ein Beispiel eines Verfahrens zur Durchführung der Reverstranskription von RNA ist im US-Patent Nr. 5,705,365 offenbart. Es wird Auswahl geeigneter Primer und PCR-Protokolle gelehrt, beispiels-20 weise bei Innis, M. et al., Hrsg. PCR Protocols 1990 (Academic Press, San Diego CA). Differentielle Expression von Messenger-RNA (mRNA) kann auch durch Reverstranskription von mRNA in cDNA verglichen werden, die dann durch Restriktionsenzyme gespalten und elektrophoretisch getrennt werden, so dass ein Vergleich der cDNA-Fragmente mög-25 lich ist, wie es bei Belavsky, US-Patent Nr. 5,814,445 gelehrt ist.

Typischerweise werden Primer am 5'-Ende mit Biotin oder einem der vielen Fluoreszenzfarbstoffe markiert. Proben werden üblicherweise mit einem Enzym markiert, wie Rettich-Peroxidase (HRP, horse radish peroxidase) und alkalischer Phosphatase, siehe Levenson und Chang, Nonisotropically Labelled Probes and Primers in: Innis et al., können aber auch z. B. mit Biotinpsoralen markiert werden. Ausführliche Beispielprotokolle zum Markieren von Primern und zum Synthesieren von

enzymmarkierten Proben sind bei Levenson und Chang angegeben. Die Proben können auch mit radioaktiven Isotopen markiert werden. Ein beispielhaftes Protokoll zum Synthetisieren radioaktiv markierter DNA- und RNA-Proben ist in Sambrook ausgeführt. Es sind eine Reihe von Reagenzien zum Einbringen verschiedener Radionuklide in DNA-Proben verfügbar, darunter Enzymprecursorsubstrate mit ³H, ¹⁴C, ³²P, ³⁵S und anderen Elementen, die in natürlich vorkommenden Nukleinsäuren nicht vorhanden sind, wie z. B. radioaktives Iod. Ferner können Primer hergestellt werden, die einen grossen Bereich von anderen radioaktiven Elementen enthalten, die kovalent an den Primer gebunden werden, wie es den Fachleuten bekannt ist. Es sind eine Reihe von Verfahren zum Nachweis von PCR-Produkten bekannt. Allgemein ist ein Schritt enthalten, der Hybridisierung der Probe und des PCR-Produkts erlaubt, der gefolgt ist ein einem oder mehreren Entwicklungsschritten, um einen Nachweis zu ermöglichen.

Wenn eine radioaktiv markierte Probe verwendet werden soll, können PCR-Produkte, mit denen die Probe hybridisiert ist durch Autoradiographie nachgewiesen werden. Als ein Beispiel kann biotinyliertes dUTP (Bethesda Research Laboratories, MD) bei der Verstärkung verwendet werden. Die markierten PCR-Produkte können dann auf einem Agarose getrennt werden, durch Southern-Transfer auf einen Nylonfilter gebracht und beispielsweise durch ein Detektorsystem mit Streptavidin/alkalischer Phosphatase nachgewiesen werden. Ein Protokoll zum Nachweis eines gebrachter biotinylierter dUTP ist z. B. bei Lo et al., Incorporation of Biotinylated dUTP, in: Innis et al. beschrieben. Schliesslich können die PCR-Produkte auf Agarosegels aufgegeben werden und Nukleinsäuren durch einen Farbstoff nachgewiesen werden, wie Ethidiumbromid, das spezifisch Nukleinsäuren erkennt.

30

Sutcliffe, US-Patent Nr. 5,807,680 lehrt ein Verfahren zum simultanen Identifizieren differentiell exprimierter mRNAs und Messung relativer Konzentrationen. Die Technik, die die Bildung von cDNA mit Ankerpri-

mern gefolgt von PCR umfasst, ermöglicht die Sichtbarmachung nahezu aller mRNA, die in einem Gewebe exprimiert ist, als deutliches Band auf einem Gel, dessen Intensität grob der Konzentration an mRNA entspricht.

5

Eine andere Gruppe von Techniken verwendet die Analyse der relativen Transkriptexpressionswerte. Jüngst wurden vier solcher Ansätze entwickelt, um umfassende Analyse mit hohem Durchsatz zu ermöglichen. Zunächst kann cDNA durch Reverstranskription aus RNA in der Probe 10 erhalten werden' (wie in den obigen Zitaten beschrieben) und einer einfachen Sequenzierung der 5'- und 3'-Enden unterzogen werden, um exprimierte Sequenzmarker (EST, expressed sequence tags) für die im Test exprimierten Gene und Kontrollproben zu definieren. Aufzählen der relativen Repräsentation der Marker von verschiedenen Proben ergibt 15 eine Abschätzung der relativen Repräsentation des Gentranskripts in den Proben.

Zweitens wurde eine Variation von ESTs entwickelt, die als SAGE (serial analysis of gene expression) bekannt sind, die eine quantitative und 20 gleichzeitige Analyse einer grossen Zahl von Transkripten ermöglicht. Die Technik verwendet die Isolierung kurzer diagnostischer Sequenzmarker und Sequenzieren, um Muster der Genexpressionscharakteristik einer Zielfunktion aufzuzeigen, und wurde verwendet, um Expressionswerte zu vergleichen, z. B. von tausenden von Genen in normalen und 25 tumorösen Zellen. Siehe Velculescu, et al., Science 270: 368-369 (1995), Zhang et al., Science 276 : 1268-1272 (1997).

Drittens wurden Ansätze auf Basis des differentiellen Displays entwickelt. In diesen Ansätzen können durch spezifische Sequenzbegrenzer 30 definierte Fragmente als einzige Identifikatoren für Gene verwendet werden, wenn sie mit Informationen über die Fragmentlänge in dem exprimierten Gen gekoppelt sind. Die relative Repräsentation eines exprimierten Gens in einer Zelle kann dann durch die relative Repräsen-

tation des dem Gen zugeordneten Fragments abgeschätzt werden. Beispiele einiger Ansätze sind Restriktionsenzymanalyse von differentiell exprimierten Sequenzen (READS, restriction enzyme analysis of differentially expressed sequences) verwendet von Gene Logic Inc., und Ge- 5 samtgenexpressionsanalyse (total gene expression analysis) von Digital Gene Technologies Inc. CLONTECH, Inc. (Palo Alto, CA) vertreiben das Delta® Differential Display Kit zur Identifizierung differentiell exprimierter Gene durch PCR. Ein anderes Verfahren ist das GeneCalling-System der CuraGen Corp., New Haven CT, das kombiniert Genidentifizierung 10 mit Datenbankabfrage eines Restriktionsendonukleaseabdrucks, bestätigt durch vergleichende PCR unter Verwendung genspezifischer Oligonukleotide, wodurch Genisolationsprozeduren optimiert werden.

Viertens wird in bevorzugten Ausführungsformen der Nachweis durch 15 eine Reihe von Techniken zur Hybridisierungsanalyse durchgeführt. In diesen Ansätzen wird RNA aus der interessierenden Probe einer Reverstranskription unterzogen, um makrierte cDNA zu erhalten. Die cDNA wird dann hybridisiert, typischerweise mit Oligonukleotiden oder cDNAs bekannter Sequenz, die auf einem Chip oder einer anderen Fläche 20 in bekannter Folge angeordnet werden. Die Lage des Oligonukleotids, das mit der markierten cDNA hybridisiert, gibt Sequenzinformationen zur cDNA, während die Menge der markierten RNA oder cDNA eine Abschätzung der Menge der relativen RNA oder cDNA in der ursprünglichen Probe gibt. Ferner ermöglicht die Technik gleichzeitige Hybridisierung 25 mit zwei oder mehr verschiedenen nachweisbaren Markern, wie zwei oder mehr radiaktiven oder fluoreszierenden Markern, gemäss dem Anspruch 1 der vorliegenden Erfindung. Die Hybridisierungsergebnisse ergeben einen direkten Vergleich der relativen Expression der Proben. Der Stand der Technik wird als Übersicht von King und Sinha, JAMA 30 286: 2280-2208 (2001) und Jain, Science, 294:621-623 (2001) und deren Literaturzitate gegeben.

Es sind im Handel eine Reihe von Kits zur Hybridisierungsanalyse erhältlich. Diese Kits ermöglichen eine Identifizierung spezifischer RNA- oder cDNA-Moleküle auf hochdichten Formaten, darunter Filter, Mikroskopieplättchen, Mikrochips und Techniken der Massenspektrometrie.

5 Beispielsweise vertreibt Affymetrix, Inc. (Santa Clara, CA) GeneChip® Probearrays, die tausende unterschiedlicher Oligonukleotidproben bekannter Sequenzen, Längen und Lokationen im Array für hochpräzise Sequenzierung von Genen enthält. Synthetische Oligonukleotidarrays kombiniert mit PCR-Verfahren können Transkriptionsverhältnisse bei

10 einer Kopie pro Zelle in komplexen biologischen Proben nachweisen, und eine Tintenstrahloligonukleotidarraytechnik kann zur genauen Anwendung eingesetzt werden. Siehe Hughes, T.R., et al., Nature Biotechnology, 19: 342-347 (2001). CLONTECH's Atlas® cDNA-Expressionsarray ermöglicht Messung der Expressionsmuster von 588

15 ausgewählten Genen. Der Gene Discovery Modul von Hyseq Inc. (Sunnyvale, CA) ermöglicht Screening von RNA mit hohem Durchsatz, ohne vorherige Sequenzinformationen bei einer Empfindlichkeit von 1 mRNA-Kopie pro Zelle. Incyte Pharmaceuticals Inc. (Palo Alto, CA) bietet Mikroarrays an, die beispielsweise geordnete Oligonukleotide von menschlichem Krebs und Signaltransduktionsgene enthält. Von anderen Firmen verwendete Techniken werden z. B. in Service, R.; Science 282: 396-399 (1998) und in Clarke P.A. Biochem. Pharmacol., 62:1311-1136 und deren Zitaten diskutiert.

Messung radioaktiver Strahlung

Die ersten elektrischen Geräte, die zum Strahlungsnachweis entwickelt wurden, waren Ionisationsdetektoren. Diese Instrumente beruhen auf

- 5 dem direkten Einfang von Elektronen und Ionen, die in einem Gas durch Strahlung erzeugt werden. Es gibt zwei grundsätzliche Typen von Detektoren, die als Ionisationskammer und Proportionalzähler bekannt sind.
- 10 Ein anderes Nachweisgerät ist der Szintillationsdetektor. Er beruht auf der Tatsache, dass gewisse Materialien, wenn sie von einem Nuklearparkikel oder von Strahlung getroffen werden, eines oder mehrere Photonen, d. h. eine Szintillation emittieren. Diese Szintillationen können bei Kopplung an ein Verstärkungsgerät, wie einen Photomultiplier, in elektrische Impulse umgewandelt werden, die dann analysiert und elektronisch gezählt werden können, um eine Information über die einfallende Strahlung zu liefern.
- 15

Auch Halbleiterdetektoren sind verbreitet verwendete Nachweisgeräte, die auf kristallinen Halbleitermaterialien beruhen, vor allem auf Silizium und Germanium. Diese Detektoren werden auch als Feststoffdetektoren bezeichnet. Das Funktionsprinzip von Halbleitern ist analog zu dem von Gasionisationsgeräten. Anstelle eines Gases ist das Medium ein festes Halbleitermaterial. Der Vorteil von Halbleiterdetektoren im Vergleich zu

- 20
- 25

Ionisationskammern ist ihre größere Energieauflösung.

Das folgende Lehrbuch beschreibt die Prinzipien von radioaktiven Nachweismethoden:

Knoll, G.F.: Radiation detection and measurements, 802 S., 3. Aufl. Dezember 1999, John Wiley and Sons, ISBN 0471073385.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Bestimmung der Ortsverteilung von mindestens zwei Mengen von Punktstrahlungsobjekten mit jeweils mengenspezifischem Strahlungstyp auf einer gemeinsamen Trägerfläche, mit folgenden Schritten:
 - a) Ermitteln einer ersten Ortsverteilung der Strahlungsintensität der Trägerfläche,
 - b) Verändern der Intensität mindestens eines mengenspezifischen Strahlungstyps mit einem zugehörigen Veränderungsfaktor,
 - c) Ermitteln mindestens einer zweiten Ortsverteilung der Strahlungsintensität der Trägerfläche und
 - d) Berechnung der Ortsverteilungen jeder der mindestens zwei Mengen von Punktstrahlungsobjekten einzeln aus der ersten und der mindestens zweiten ermittelten Ortsverteilung.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der Veränderungsschritt b) und der Schritt c) zur Ermittlung der mindestens zweiten Ortsverteilung der Strahlungsintensität der Trägerfläche, vorzugsweise mit einem unterschiedlichen Veränderungsfaktor, mindestens einmal wiederholt werden.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass eine ermittelte Ortsverteilung der Strahlungsintensität durch eine zugehörige Pixelmatrix dargestellt wird, wobei ein Pixelwert der Matrix die Strahlungsintensität eines zugehörigen Orts auf der Trägerfläche repräsentiert.
4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Ortsverteilung jeder der mindestens zwei Mengen von Punktstrahlungsobjekten einzeln auf Basis der Pixelmatrizen bestimmt wird.

5. Verfahren nach Anspruch 3 oder 4, dadurch gekennzeichnet, dass die Ortsverteilung jeder der mindestens zwei Mengen von Punktstrahlungsobjekten einzeln auf Basis von Intensitäten bestimmt wird, die sich durch die Summation von Pixelwerten definierter, insbesondere benachbarter, Elemente der Pixelmatrix ergeben.
6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass jede Menge von Punktstrahlungsobjekten aus mindestens einem strahlenden, insbesondere radioaktiv strahlenden, Typ von Isotopen besteht.
7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass jede Menge von Punktstrahlungsobjekten aus lichtemittierenden, insbesondere fluoreszierenden, phosphoreszierenden und/oder lumineszierenden, Substanzen besteht.
8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass für mindestens eine Menge unterschiedlicher Punktstrahlungsobjekte an mindestens einem Ort auf der Trägerfläche mindestens ein Kalibrierungspunkt mit bekannter Strahlung vorhanden ist.
9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass das Verhältnis der Veränderungsfaktoren der mengenspezifischen Strahlungstypen zwischen 5% bis 90%, vorzugsweise zwischen 10% bis 70%, insbesondere zwischen 15% und 50%, liegt.
10. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass der Veränderungsfaktor durch Verwendung mindestens eines Absorbers realisiert wird.

11. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass der Veränderungsfaktor durch radioaktiven Zerfall der Punktstrahlungsobjekte der mindestens zwei Mengen realisiert wird, wobei vorzugsweise die jeweiligen Punktstrahlungsobjekte der mindestens zwei Mengen unterschiedliche Halbwertszeiten aufweisen.

12. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass der Veränderungsfaktor durch eine unterschiedliche Empfindlichkeit eines zur Ermittlung einer Ortsverteilung der Strahlungsintensität der Trägerfläche verwendeten Detektors für den jeweils mengenspezifischen Strahlungstyp der mindestens zwei Mengen von Punktstrahlungsobjekten realisiert wird.

13. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Ortsverteilungen mit einem ortsauflösenden Detektor für Alpha-, Beta-, Gamma- und/oder Röntgenstrahlung ermittelt werden.

14. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Ortsverteilungen mit einem sogenannten Phosphor-Imager-Detektor ermittelt werden.

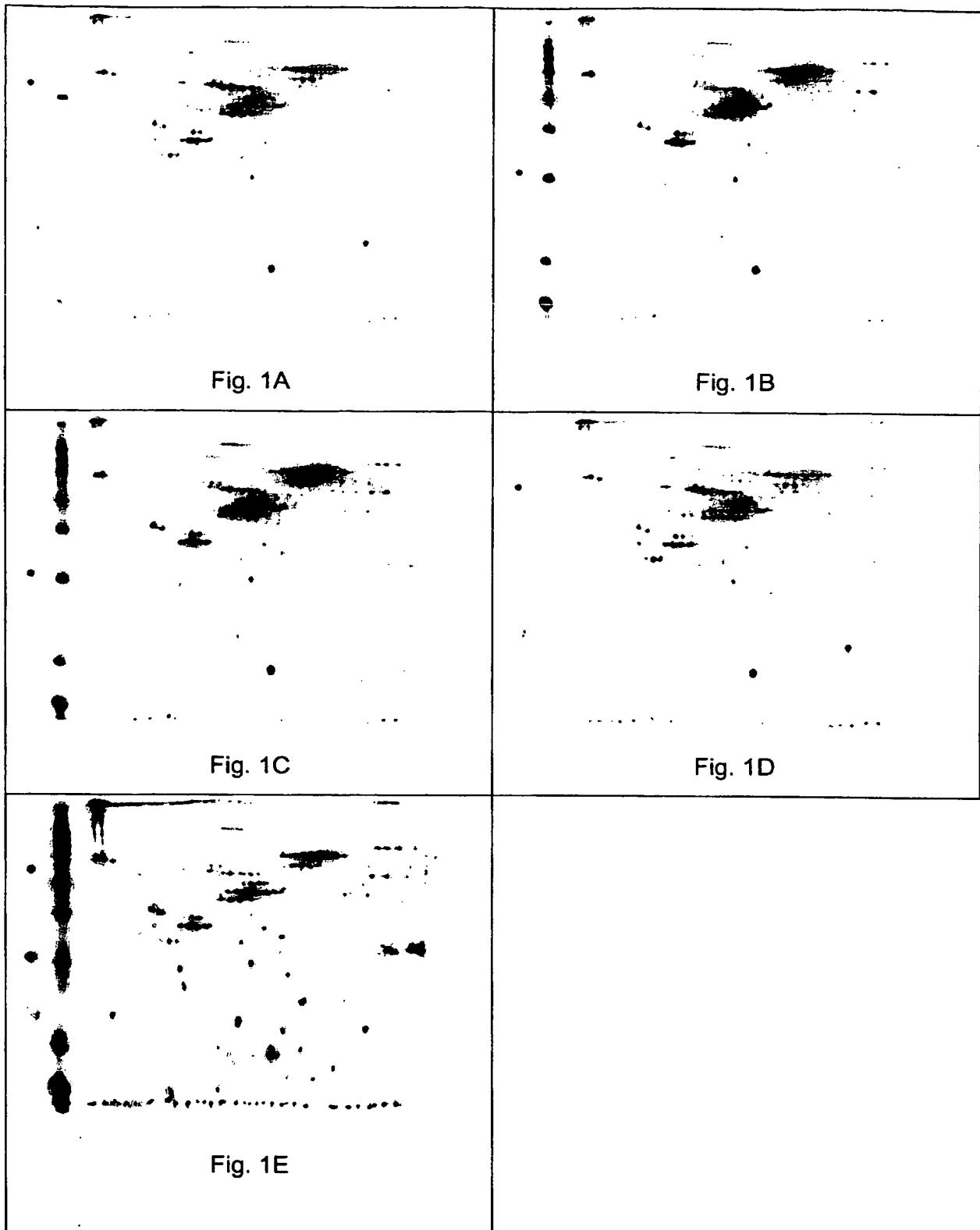
15. Verfahren nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, dass eine unterschiedliche Empfindlichkeit eines zur Ermittlung einer Ortsverteilung der Strahlungsintensität der Trägerfläche verwendeten Phosphor-Imager-Detektors für den jeweils mengenspezifischen Strahlungstyp dadurch erzielt wird, dass der Phosphor des Phosphor-Imager-Detektors zusätzlich Atome mit hoher Ordnungszahl Z, insbesondere Blei, und/oder Atome mit niedriger Ordnungszahl Z enthält.

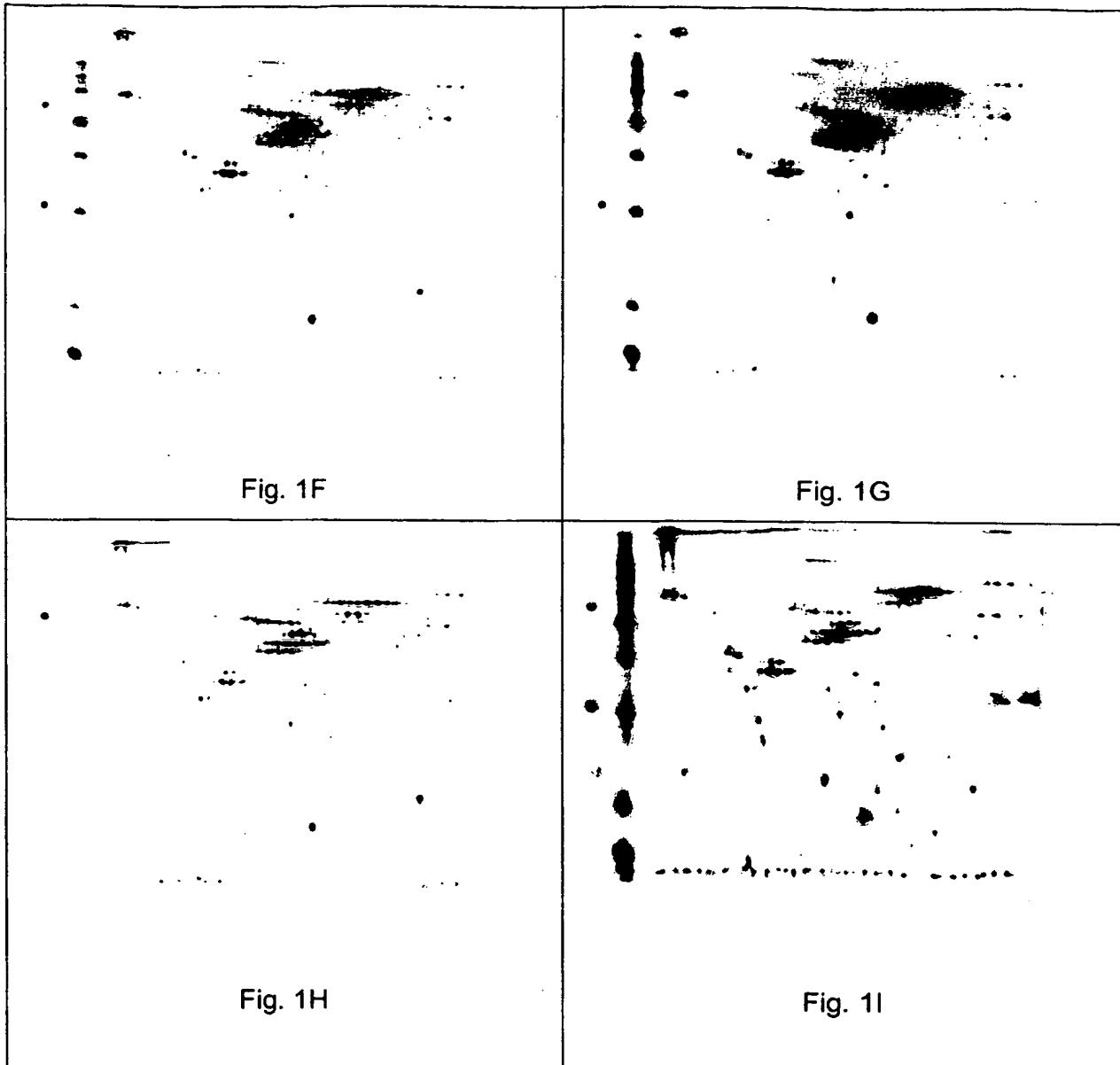
16. Verfahren nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, dass die erste Ortsverteilung der Strahlungsintensität der Trägerfläche durch ei-

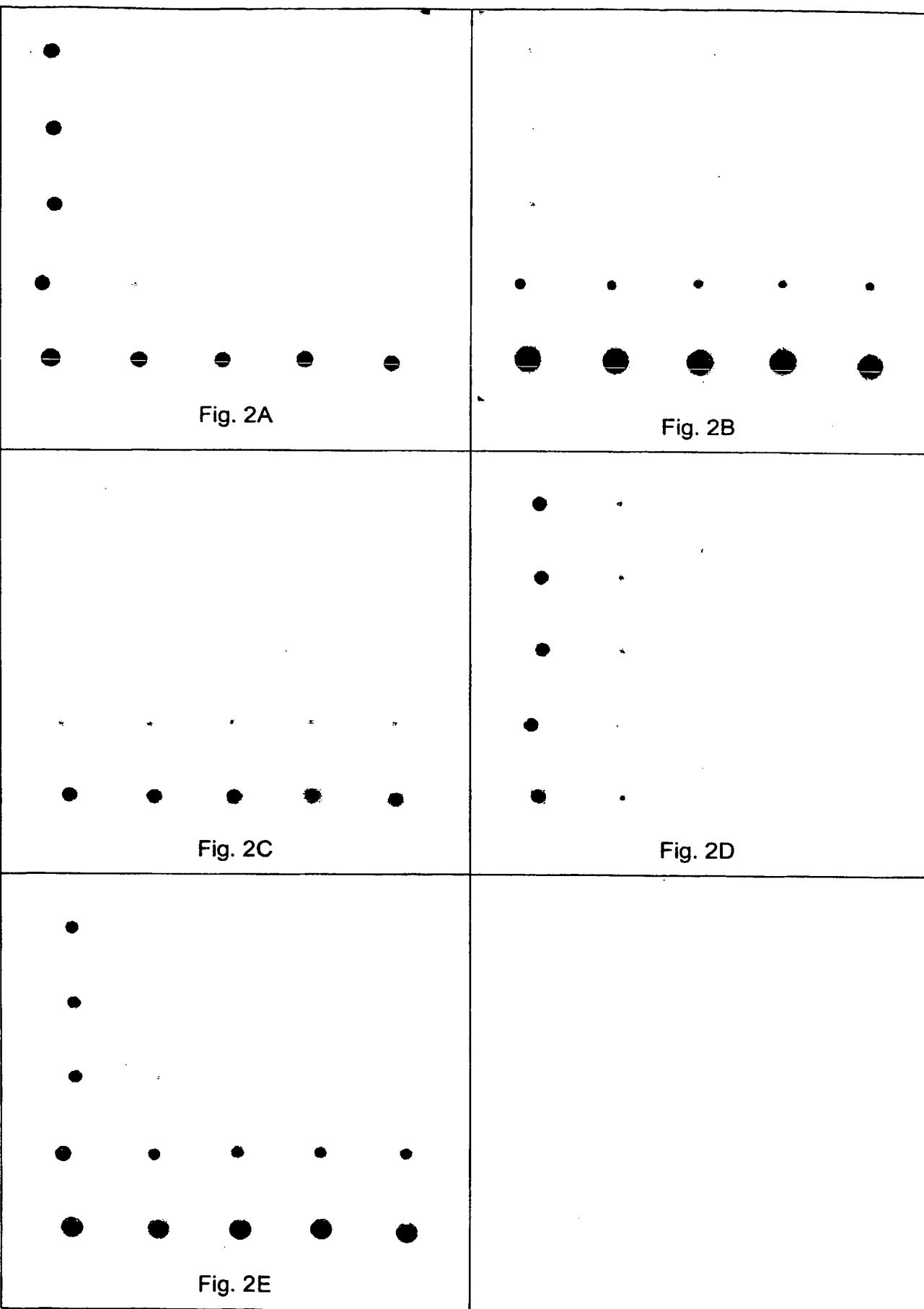
nen ersten Phosphor-Imager-Detektor und die mindestens zweite Ortsverteilung der Strahlungsintensität der Trägerfläche durch einen mindestens zweiten Phosphor-Imager-Detektor gleichzeitig ermittelt werden, wobei die Empfindlichkeit des ersten Phosphor-Imager-Detektors und die Empfindlichkeit des mindestens zweiten Phosphor-Imager-Detektors für den jeweils mengenspezifischen Strahlungstyp unterschiedlich ist.

17. Verfahren nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, dass der erste und der mindestens zweite Phosphor-Imager-Detektor an gegenüberliegenden Seiten der Trägerfläche angebracht werden.
18. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Ortsverteilungen mit einem sogenannten Flach-Detektor ermittelt werden.
19. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die erste und die mindestens zweite Ortsverteilung der Strahlungsintensität mit einem gleichartigen Detektor ermittelt wird.
20. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens zwei zu analysierende Stoffe mit jeweils einer Menge von Punktstrahlungsobjekten markiert, die so markierten Stoffe gemischt und das Gemisch anschließend auf die Trägerfläche, insbesondere in Form eines flächenartigen Analysemittels, aufgebracht wird.
21. Verfahren nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, dass die zu analysierenden Stoffe Peptide, Proteine und/oder Oligonukleotide sind.

22. Verfahren nach Anspruch 20 oder 21, dadurch gekennzeichnet, dass das Analysemittel ein Proteingel, Nukleinsäure-Array, Protein-Array, ELISA-Array und/oder ein Blot ist.







INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP 03/05797

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 G01T1/29 G01N27/447

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 G01T G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

WPI Data, EPO-Internal, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MONRIBOT-ESPAÑE C ET AL: "Differential gel exposure, a new methodology for the two-dimensional comparison of protein samples." PROTEOMICS, vol. 2, no. 3, March 2002 (2002-03), pages 229-240, XP009017796 ISSN 1615-9853 cited in the application the whole document ---	1-9, 12-14, 18-22
Y	---	15-17 -/-

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

23 September 2003

Date of mailing of the international search report

09/10/2003

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Johnson, K

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int'l. Application No.
PCT/EP 03/05797

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 520 182 A (LEIGHTON S B ET AL) 28 May 1996 (1996-05-28)	1,3-6, 10,13, 18-22 15-17
Y	column 3, line 11 - line 33 column 10, line 38 -column 11, line 56 figure 6 ---	
X	WO 86 06835 A (WISCONSIN ALUMNI RESEARCH FOUNDATION) 20 November 1986 (1986-11-20) page 1, paragraph 4 -page 4, paragraph 2 page 9, paragraph 4 -page 10, paragraph 1 page 25, paragraph 2 -page 33, paragraph 2 figure 11; table IV ---	1,3-6,8, 12,13, 18-22
X	US 4 389 670 A (DAVIDSON J B ET AL) 21 June 1983 (1983-06-21) column 2, line 11 -column 7, line 36 figures ---	1-14, 18-22
A	RICCI E ET AL: "Theory and experiment in rapid, sensitive Helium-3 activation analysis" ANALYTICAL CHEMISTRY, vol. 37, no. 6, May 1965 (1965-05), pages 742-748, XP002255365 ISSN 0003-2700 page 745; figure 3 ---	1,6,11, 13
A	ASTRI C S ET AL: "Simultaneous determination of Boron and Lithium by charged particle activation analysis" ANALYTICAL CHEMISTRY, vol. 53, no. 6, May 1981 (1981-05), pages 765-770, XP002255366 ISSN 0003-2700 cited in the application -----	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/AU 03/05797

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
US 5520182	A 28-05-1996	US	5301671 A	12-04-1994
		AU	2750792 A	27-04-1993
		WO	9305698 A1	01-04-1993
WO 8606835	A 20-11-1986	AU	5951486 A	04-12-1986
		EP	0220313 A1	06-05-1987
		WO	8606835 A1	20-11-1986
US 4389670	A 21-06-1983	NONE		

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Intern: Aktenzeichen
PCT/EP 03/05797

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 G01T1/29 G01N27/447

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 G01T G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

WPI Data, EPO-Internal, PAJ

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	MONRIBOT-ESPAÑE C ET AL: "Differential gel exposure, a new methodology for the two-dimensional comparison of protein samples." PROTEOMICS, Bd. 2, Nr. 3, März 2002 (2002-03), Seiten 229-240, XP009017796 ISSN 1615-9853 in der Anmeldung erwähnt	1-9, 12-14, 18-22
Y	das ganze Dokument ----	15-17 -/-

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung,

eine Benutzung, eine Aussstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung: die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung: die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

*& Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

23. September 2003

09/10/2003

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Johnson, K

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Inter
PCT/EP 03/05797

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	US 5 520 182 A (LEIGHTON S B ET AL) 28. Mai 1996 (1996-05-28)	1, 3-6, 10, 13, 18-22 15-17
Y	Spalte 3, Zeile 11 - Zeile 33 Spalte 10, Zeile 38 - Spalte 11, Zeile 56 Abbildung 6 ---	
X	WO 86 06835 A (WISCONSIN ALUMNI RESEARCH FOUNDATION) 20. November 1986 (1986-11-20) Seite 1, Absatz 4 - Seite 4, Absatz 2 Seite 9, Absatz 4 - Seite 10, Absatz 1 Seite 25, Absatz 2 - Seite 33, Absatz 2 Abbildung 11; Tabelle IV ---	1, 3-6, 8, 12, 13, 18-22
X	US 4 389 670 A (DAVIDSON J B ET AL) 21. Juni 1983 (1983-06-21) Spalte 2, Zeile 11 - Spalte 7, Zeile 36 Abbildungen ---	1-14, 18-22
A	RICCI E ET AL: "Theory and experiment in rapid, sensitive Helium-3 activation analysis" ANALYTICAL CHEMISTRY, Bd. 37, Nr. 6, Mai 1965 (1965-05), Seiten 742-748, XP002255365 ISSN 0003-2700 Seite 745; Abbildung 3 ---	1, 6, 11, 13
A	ASTRI C S ET AL: "Simultaneous determination of Boron and Lithium by charged particle activation analysis" ANALYTICAL CHEMISTRY, Bd. 53, Nr. 6, Mai 1981 (1981-05), Seiten 765-770, XP002255366 ISSN 0003-2700 in der Anmeldung erwähnt -----	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zum selben Patentfamilie gehören

Internationale Patentzeichen

PCT/EP 03/05797

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung		Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
US 5520182	A	28-05-1996	US	5301671 A		12-04-1994
			AU	2750792 A		27-04-1993
			WO	9305698 A1		01-04-1993
WO 8606835	A	20-11-1986	AU	5951486 A		04-12-1986
			EP	0220313 A1		06-05-1987
			WO	8606835 A1		20-11-1986
US 4389670	A	21-06-1983	KEINE			